

Gdański Uniwersytet Medyczny

Artur Antolak

*Ocena immunohistochemiczna obecności
receptorów ErbB (HER) w rakach brodawkowatych
tarczycy oraz ich korelacja z wybranymi
parametrami morfologicznymi i klinicznymi*

Praca na stopień doktora nauk medycznych

*Katedra i Klinika Endokrynologii i Chorób
Wewnętrznych*

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Sworczak

Gdańsk 2016r

Spis treści

1.	WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I TERMINÓW.....	3
2.	WYKAZ TABEL I RYCIN.....	5
3.	WSTĘP	7
3.1.	Epidemiologia raka tarczycy	7
3.2.	Embriologia i rozwój tarczycy	9
3.3.	Patofizjologia tarczycy.....	10
3.4.	Onkogeneza raka tarczycy.....	11
3.5.	Szlaki sygnałowe komórek i ich receptory.....	12
3.6.	Budowa receptorów błonowych, ze szczególnym uwzględnieniem receptorów kinaz tyrozynowych.....	13
3.7.	Omówienie receptorów rodziny Erb (HER).....	16
3.8.	Model aktywacji receptorów kinaz tyrozynowych.....	17
4.	UZASADNIENIE WYBORU TEMATU	19
5.	CELE PRACY	21
6.	MATERIAŁY I METODY	22
6.1.	Charakterystyka grupy badanej	22
6.2.	Charakterystyka grupy kontrolnej.....	27
6.3.	Materiał badawczy	27
6.4.	Odczyny immunohistochemiczne i metody ich oceny	27
6.4.1.	EGFR (HER1).....	29
6.4.2.	HER2	30
6.4.3.	HER3	31
6.4.4.	HER4	31

6.5.	Analiza statystyczna	32
7.	WYNIKI.....	34
7.1.	Ocena ekspresji badanych antygenów.....	34
7.1.1.	Wyniki pomiarów IHC.....	34
7.1.2.	Zależności pomiędzy liczbą komórek a intensywnością odczynu IHC.....	41
7.1.3.	Ocena ekspresji badanych antygenów przy użyciu wartości <i>score</i>	41
7.2.	Zależności między ekspresją (wskaźnik <i>score</i>) badanych antygenów a danymi kliniczno-patologicznymi.....	44
7.2.1.	Płeć i wiek	44
7.2.2.	Zaawansowanie kliniczne nowotworu	46
7.2.3.	Cechy histopatologiczne nowotworu	47
7.3.	Analiza wieloczynnikowa	50
7.3.1.	ErbB1.....	51
7.3.2.	ErbB2.....	52
7.3.3.	ErbB3.....	53
7.3.4.	ErbB4.....	54
7.4.	Podsumowanie wyników.....	54
8.	DYSKUSJA.....	56
9.	WNIOSKI.....	68
10.	STRESZCZENIE	69
11.	SUMMARY	71
12.	PIŚMIENNICTWO.....	73

1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I TERMINÓW

Akt – kinaza B, kinaza białkowa serynowo-treoninowa (zwana też PKB)

ATC (*Anaplastic Thyroid Cancer*) – rak anaplastyczny tarczycy

ATP (*Adenosine Triphosphate*) - adenzynotrójfosforan

DTC (*Differentiated Thyroid Cancer*) – zróżnicowany rak tarczycy

EGF (*Epidermal Growth Factor*) - nabłonkowy czynnik wzrostu

EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) - receptor nabłonkowego czynnika wzrostu

FTC (*Follicular Thyroid Carcinoma*) – rak pęcherzykowy tarczycy

ERK, MAP (*Extracellular signal-Regulated Kinase, Mitogen Activated Protein kinase*) - kinazy regulowane sygnałami zewnątrzkomórkowymi z grupy kinaz aktywowanych mitogenami

FNAB (*Fine Needle Aspiration Biopsy*) – BACC (biopsja aspiracyjna cienkoigłowa celowana)

GPCR (*G-Protein Coupled Receptors*) - receptory sprzężone z białkami G

IHC (immunohistochemistry) - immunohistochemia

IR (*Incidence Rate*) - współczynnik zapadalności (zachorowalności) ^{liczba nowych przypadków w danym roku na 100 000 mieszkańców}

JM (*Juxtamembrane Domain*) - domena podbłonowa

JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) – jedna z czterech grup kinaz zidentyfikowanych u ssaków, określane też jako kinazy aktywowane stresem

MAP (*Mitogen-Activated Protein*) – białko aktywowane mitogenami (grupa kinaz serynowo-treoninowych)

MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) - kinazy białkowe aktywowane mitogenami (grupa kinaz serynowo-treoninowych)

MTC (*Medullary Thyroid Carcinoma*) – rak rdzeniasty tarczycy

NTRK1 (*Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor Type 1*) - neurotropowy receptor kinazy tyrozynowej typu 1

OPC (*Occult Papillary Carcinoma*) – ukryty (niemy klinicznie) rak brodawkowaty tarczycy

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy

PKC (*Protein Kinase C*) - kinaza białkowa C

PMC (*Papillary Microcarcinoma*) – mikrorak brodawkowaty tarczycy

PTC (*Papillary Thyroid Carcinoma*) - rak brodawkowaty tarczycy

PTCC (*Papillary Thyroid Carcinoma, Classical*) - rak brodawkowaty tarczycy, typ klasyczny

PTCFV (*Papillary Thyroid Carcinoma, Follicular Variant*) - rak brodawkowaty tarczycy, wariant pęcherzykowy

RAS – rodzina białek wewnątrzkomórkowych o aktywności GTPazowej, uczestniczących w transdukcji sygnałów wewnątrzkomórkowych

RET – receptor z grupy receptorów wykazujących aktywność kinazy tyrozynowej (RTKs)

RTKs (*Receptor Tyrosine Kinases*) - receptor kinaz tyrozynowych

SH1 – (*Src homology 1*) - Src homology domain

T3 (*Triiodothyronine*) - trijodotyronina

T4 (*Thyroxine*) - tyroksyna

TBG (*Thyroxine-Binding Globulin*) – białko wiążące tyroksynę

TC (*Thyroid Cancer*) – rak tarczycy

TKD (*Tyrosine Kinase Domain*) - domena z aktywnością kinazy tyrozynowej

TGD (*Thyroglossal Duct*) - przewód językowo-gardłowy

TR (*Thyroid Hormone Receptor*) – receptor dla hormonu tarczycy

TRH (*Thyrotropin-Releasing Hormone*) - tyreoliberyna, hormon uwalniający tyreotropinę

TSH (*Thyroid-Stimulating Hormone*) - tyreotropina, hormon tyreotropowy

TTR (*Transthyretin*) - transtyrenina

2. WYKAZ TABEL I RYCIN

SPIS TABEL

Tabela 1. Współczynnik zapadalności na raka tarczycy u obu płci, WHO 2012.....	8
Tabela 2. Ekspresja antygenu ErbB1 w ocenie immunohistochemicznej.....	35
Tabela 3. Ekspresja antygenu ErbB2 w ocenie immunohistochemicznej.....	37
Tabela 4. Ekspresja antygenu ErbB3 w ocenie immunohistochemicznej.....	39
Tabela 5. Ekspresja antygenu ErbB4 w ocenie immunohistochemicznej.....	40
Tabela 6. Korelacje pomiędzy ilością komórek z pozytywnym odczynem IHC a nasileniem tego odczynu.....	41
Tabela 7. Ekspresja antygenów ErbB wyrażona w punktacji score (0-300) w PTC i tkance zdrowej..	41
Tabela 8. Wzajemne korelacje pomiędzy wartościami <i>score</i>	43
Tabela 9. Korelacje pomiędzy wartościami <i>score</i> a intensywnością odczynu oraz liczbą komórek wykazujących dodatni odczyn w ocenie IHC.....	44
Tabela 10. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a wiekiem i płcią pacjentów.....	46
Tabela 11. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a wielkością pierwotnego ogniska nowotworowego.....	46
Tabela 12. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a zajęciem węzłów chłonnych.....	47
Tabela 13. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a wieloogniskowym występowaniem nowotworu.....	47
Tabela 14. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a występowaniem nowotworu w obu płatach tarczycy jednocześnie.....	48
Tabela 15. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a naciekaniem naczyń przez nowotwór.....	48
Tabela 16. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a naciekaniem torebki guza przez nowotwór.....	49
Tabela 17. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a naciekaniem torebki tarczycy.....	50

SPIS RYCIN

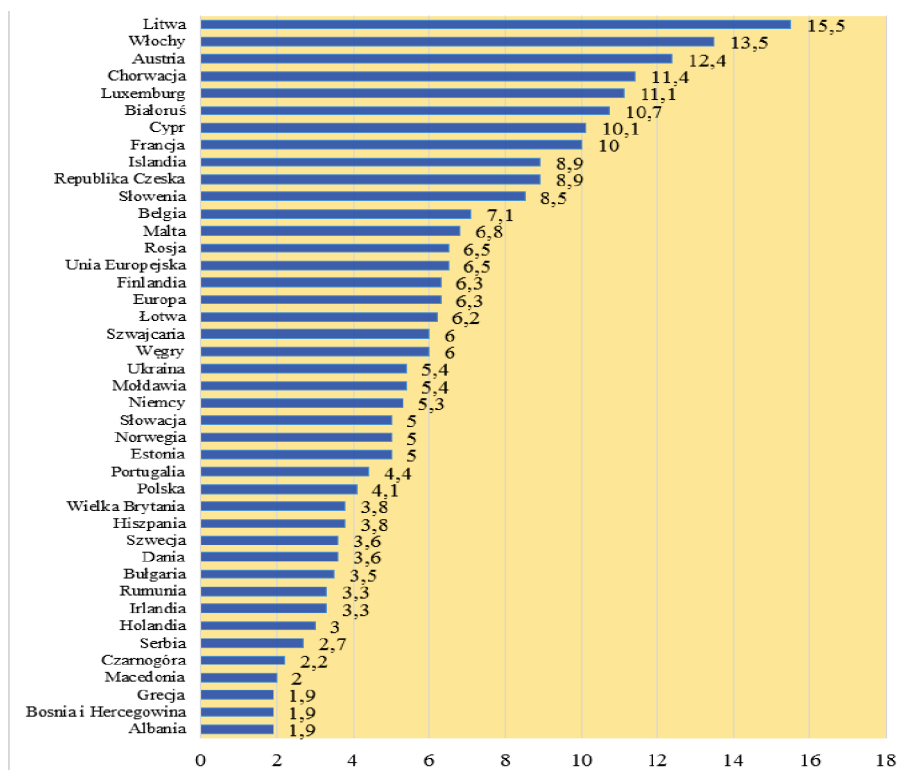
Rycina 1. Rak brodawkowy tarczycy, typ klasyczny (HE, x200).....	9
Rycina 2. Liczba PTC jednoogniskowych, wieloogniskowych - jedno- i obustronnych.....	22
Rycina 3. Liczba PTC jednoogniskowych, wieloogniskowych - jedno- i obustronnych.....	23
Rycina 4. Porównanie liczby przypadków wg cechy pT.....	25
Rycina 5. Porównanie liczby przypadków wg cechy pT.....	25
Rycina 6. Regionalne węzły chłonne - cecha pN.....	26
Rycina 7. Regionalne węzły chłonne - cecha pN.....	26
Rycina 8. Ekspresja EGFR w PTC w lokalizacji błonowej na poziomie 2 (EGFR, x200).....	34
Rycina 9. Ekspresja EGFR w PTC w lokalizacji cytoplazmatycznej na poziomie 1 oraz w lokalizacji błonowej na poziomie 2 (EGFR, x200).....	35
Rycina 10. Ekspresja HER2 w PTC na poziomie 1 (HER2, x400).....	36
Rycina 11. Ekspresja HER2 w lokalizacji błonowej na poziomie 2 (HER2, x200).....	37
Rycina 12. Ekspresja HER3 w lokalizacji jądrowej w PTC (HER3, x400).....	38
Rycina 13. Ekspresja HER3 w lokalizacji jądrowej w PTC (HER3, x200).....	39
Rycina 14. Ekspresja HER4 w PTC w lokalizacji jądrowej na poziomie 2 oraz w lokalizacji cytoplazmatycznej na poziomie 1 (HER4, x200).....	40
Rycina 15. Ekspresja antygenów ErbB wyrażona w punktacji <i>score</i> (0-300). Poziome linie oznaczają mediany.....	42
Rycina 16. Ekspresja antygenów ErbB2 w zależności od płci pacjentów. Poziome linie oznaczają medianę.....	45
Rycina 17. Ekspresja ErbB4 w lokalizacji jądrowej w guzach naciekających i nienaciekających torebkę tarczycy.....	50
Rycina 18. Analiza wieloczynnikowa - związek pomiędzy ekspresją ErbB1 (odczyn błonowy) a występowaniem przerzutów w węzłach chłonnych.....	52
Rycina 19. Analiza wieloczynnikowa - związek pomiędzy ekspresją ErbB3 (odczyn jądrowy) a naciekaniem torebki tarczycy.....	53

3. WSTĘP

3.1. Epidemiologia raka tarczycy

Rak tarczycy (Thyroid Cancer – TC) jest nowotworem rzadkim i jest jednym z niewielu nowotworów spoza układu rozrodczego, częściej występujących u kobiet niż u mężczyzn [1]. Raki tarczycy stanowią zdecydowaną większość (>90%) wszystkich nowotworów układu endokrynnego [2]. Średnia częstość występowania TC na terenach na których nie było katastrof nuklearnych i narażenia na promieniowanie radioaktywne wynosi około 2,0-3,8 na 100 000 mieszkańców u kobiet oraz odpowiednio 1,2-2,6 na 100 000 u mężczyzn [3][4]. Najwyższą obecnie (2012) zachorowalność na TC (mierzoną współczynnikiem zapadalności – IR) obserwuje się na Litwie (IR – 15,5), we Włoszech (IR – 13,5), w Austrii (IR – 12,4), a najniższą Albanii, Bośni i Grecji (IR - 1,9) [5] (Tabela 1). Stosunkowo wysoki IR (8,9-11,1) zaobserwowano we Francji, Islandii, Japonii i na Hawajach, a w niektórych krajach europejskich takich jak: Szwecja, Dania, Holandia i Słowacja jest on wyraźnie niższy (3-5) [4][5]. Przyczyny tych różnic nie do końca są jasne.

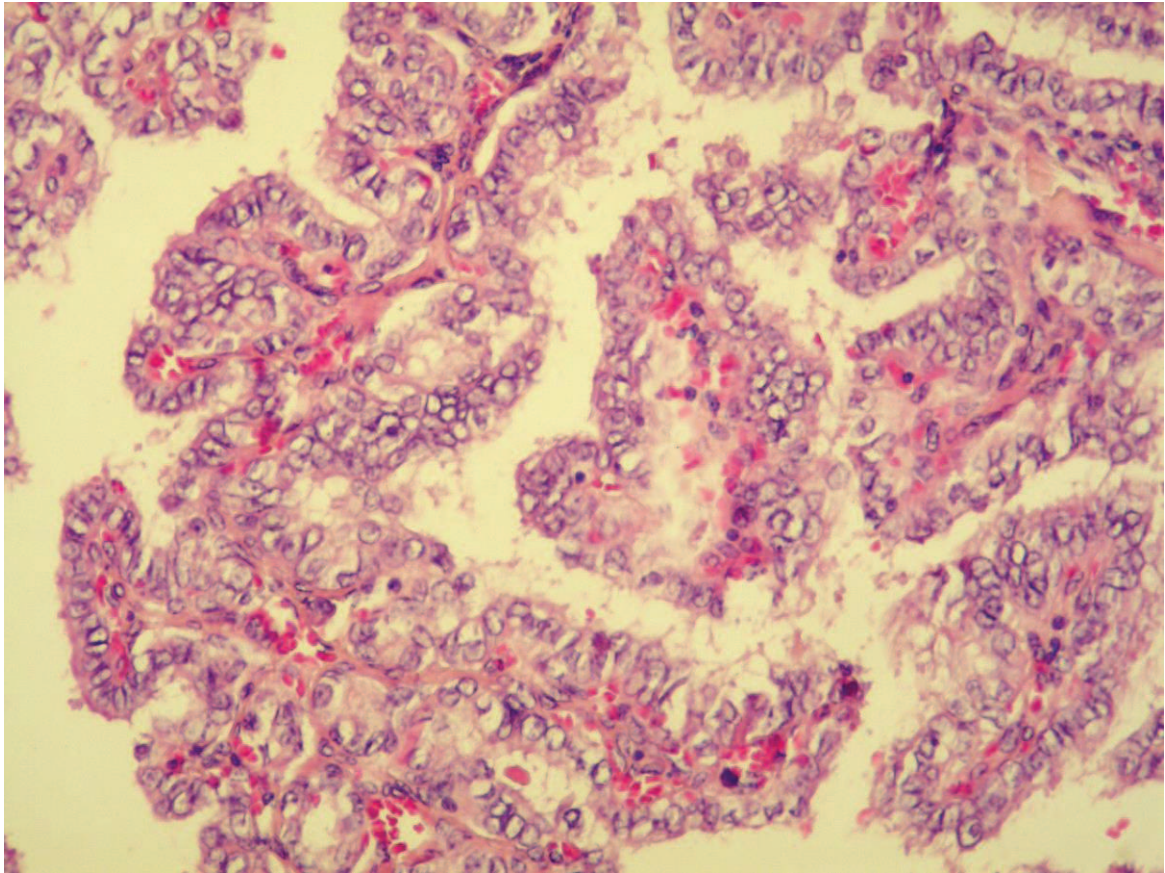
Tabela 1. Współczynnik zapadalności (liczba nowych zachorowań na 100 000 na rok) na raka tarczycy u obu płci, WHO 2012



Geograficzne różnice w częstości występowania TC mogą być związane z wielkością podaży jodu, jednak uważa się obecnie, że wysokie spożycie jodu jest związane jedynie z niewielkim wzrostem możliwości rozwoju TC [4]. Co więcej, nie stwierdzono znamiennej wpływu innych czynników wynikających ze stylu życia na rozwój TC [4].

Oddzielną kwestią jest występowanie TC u dzieci poniżej 15 roku życia – analogiczna częstość występowania tego nowotworu w tej grupie wiekowej wynosi średnio 1-2 zachorowań na 1 000 000 mieszkańców, a więc jest stosunkowo niska [6]. W analizach przeprowadzonych w latach 1980 – 2000 w Polsce u dzieci w wieku do 15 lat stwierdzono 91 nowych zachorowań na TC [7], w tym tylko 6 przypadków w latach 1980-1986 i aż 85 w latach 1987 – 2000. Po roku 1986, w którym doszło do awarii elektrowni w Czarnobylu, na terenie Polski i krajów ościennych przeprowadzono liczne analizy dotyczące zwiększonego występowania schorzeń tarczycy (w tym nowotworów złośliwych) [3].

Rycina 1. Rak brodawkowaty tarczycy, typ klasyczny (HE, x200). Zbiory własne.



3.2. Embriologia i rozwój tarczycy

Gruzoł tarczowy powstaje ok. 4 tygodnia ciąży przez pogrubienie endodermy zlokalizowanej w środkowej części dna prymitywnej gardzieli, pomiędzy pierwszym a drugim uchyłkiem gardłowym [8]. Prymitywna tarczyca rozwija się z uchyłka który początkowo ma kształt sferyczny, a później przybiera kształt płacikowy. Przez następne trzy tygodnie prymitywna tkanka tarczycowa penetruje leżącą poniżej tkankę mezenchymalną, przemieszczając się do przodu i dołu w kierunku kości gnykowej i chrząstek krtaniowych, ostatecznie osiągając przednio-dolną część szyi. Droga przemieszczania się uchyłka formuje się w tzw. przewód językowo-gardłowy (TGD), który dalej podlega dalszej ewolucji. Rozwój i kształtowanie się gruczołu tarczowego w trakcie embriogenezy, są kontrolowane przez zaprogramowane w genomie informacje, które uwalniane w odpowiednim czasie, miejscu i na odpowiednim poziomie, są instrukcjami rozpoznawalnymi przez odpowiednie specjalizujące się komórki. Intensywne badania ostatnich 30 lat wykazały, że wiele tych procesów sygnalizacji komórkowej w trakcie embriogenezy jest pośredniczone przez

wydzielanie i wiązanie błonowe odpowiednich molekuł [9], a szlaki sygnałowe wykorzystujące receptory o aktywności kinaz tyrozynowych jednymi z ważniejszych.

3.3. Patofizjologia tarczycy.

Hormony produkowane przez komórki pęcherzykowe tarczycy mają istotne znaczenie dla prawidłowego wzrostu i rozwoju tkanek, procesów różnicowania (w szczególności rozwoju ośrodkowego układu nerwowego, na wczesnych jego etapach [10]) i mechanizmów równowagi oraz regulacji metabolizmu [11][12][13]. Działanie hormonów tarczycy jest możliwe dzięki obecności receptorów w tkankach docelowych, które należą do nadrodziny receptorów jądrowych [11] i są czynnikami transkrypcyjnymi, aktywującymi lub hamującymi ekspresję wielu genów docelowych [14]. Wyróżnia się dwa rodzaje jądrowych receptorów dla hormonów tarczycy (TR – thyroid hormone receptor) – TR α i TR β , ich geny lokalizują się na dwóch różnych chromosomach – odpowiednio 17 i 3 chromosomie [11][13]. Receptory te są również docelowym punktem uchwytu dla innych ligandów takich jak: retinoidy, witamina D, kwasy tłuszczowe i prostaglandyny [11].

Komórki nabłonka pęcherzykowego tarczycy produkują duże ilości tyroksyny (T4) oraz zdecydowanie mniejsze ilości trijodotyroniny (T3) [15]. Druga z nich jest aktywną postacią hormonu tarczycy i w większości jest wytwarzana z T4 w tkankach docelowych. Oba hormony uwalniane są do krwiobiegu (postać nieaktywna T4 ~ 80% i aktywna T3 ~ 20% [13]), gdzie łączą się odwracalnie z białkami osocza – globuliną (TBG) i transtyreniną (TTR) [15] oraz albuminą. Tylko niewielka frakcja T3 i T4 występuje w osoczu w stanie niezwiązany (wolny). Białka te pełnią funkcję bufora stabilizującego poziom związanej i niezwiązanej T4 i T3 w osoczu krwi, zapewniając w ten sposób ich stałą dostępność dla tkanek obwodowych. Konwersja T4 do T3 odbywa się przez odjodowanie (przy udziale dejodynazy D1 w wątrobie i nerkach, dejodynazy D2 w mózgu i przysadce oraz dejodynazy D3 wstępującej w mózgu, łożysku i macicy ciężarnej, która deaktywuje (przez dejodyzację) zarówno T3 jak i T4, chroniąc w ten sposób płód przed nadmiarem hormonów tarczycy) [14]. Hormony tarczycy pozostają w ujemnym sprzężeniu zwrotnym z hormonem tyreotropowym (TSH) produkowanym przez przysadkę, który jest kontrolowany w tym samym mechanizmie przez tyreoliberynę (TRH) produkowaną w podwzgórze.

3.4. Onkogeneza raka tarczycy.

Czynniki genetyczne odgrywają istotną rolę w powstawaniu TC. Obecnie nie ma przekonujących dowodów na to, że TC wywodzą się z komórek pnia, uważa się że PTC i FTC wywodzą się z wysokodróżnicowanej komórki pęcherzykowej gruczołu tarczowego [16]. Wysokodróżnicowane TC wykazują najmniej cech niestabilności chromosomalnych, nieco więcej niskodróżnicowane, a najczęściej anaplastyczne raki tarczycy (ATC). Badania wykonane metodami PCR wykazały, że liczba uszkodzeń genomu PTC jest bardzo duża, szczególnie statystycznie największa u młodych pacjentów. Stosunkowo łagodny przebieg tego nowotworu wskazuje, że uszkodzenia te mają niewielki wpływ na progresję złośliwości biologicznej [16]. Wykazano ponadto, że mikroogniska PTC oraz ATC znalezione w tym samym guzie mogą zawierać te same zaburzenia genetyczne, co może potwierdzać teorię rozwoju postaci bardziej złośliwej TC z mniej złośliwej (np. PTC). Mimo znacznej klinicznej heterogenności PTC, stwierdzono duże podobieństwa w profilu ekspresji genów w tych nowotworach. Nieprawidłowości genetyczne związane z rozwojem PTC, najczęściej dotyczą genów kodujących białka o aktywności kinaz takich jak: *BRAF*, *RET*, *RAS*, *NTRK1*. Mutacja genu *BRAF* jest najczęstszym genetycznym zaburzeniem w PTC, w ok 40-45% tych guzów [13]. Najczęstszą mutacją *BRAF* w PTC jest punktowa mutacja, w pozycji 1796 (*BRAF* V600E), która obejmuje 98% do 99% wszystkich mutacji *BRAF* w PTC. Białko BRAF wykazuje aktywność kinazy serynowo-treoninowej jest odpowiedzialne za transdukcję sygnału mitogennego od RAS i RET do szlaku kinaz MAP. Obecność tej mutacji wiązana jest z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego nowotworu [16] (pozatarczycowe szerzenie się, przerzuty odległe), ale nie wiąże się - wg niektórych badań - z gorszym rokowaniem [17]. Kolejnym najczęstszym zaburzeniem genowym, charakterystycznym dla PTC [18], jest rearanżacja genu *RET*, zwana *RET/PTC*, kodującego receptor kinazy tyrozynowej (RTK), rearanżacja ta obecna jest w 10-20% PTC, częściej u dzieci i młodych dorosłych narażonych na promieniowanie radioaktywne. W populacji dzieci narażonych na promieniowanie radioaktywne w Czernobylu w okresie 4-10 lat stwierdzono wyraźny wzrost podtypu tej mutacji – *RET/PTC3* [19]. Mutacja *RET/PTC* jest ponadto wiązana ze zwiększoną skłonnością do przerzutów odległych, ale mniejszym stopniem zaawansowania w trakcie rozpoznania. Punktowa mutacja genu *RAS* obecna jest w ok. 10% PTC i dotyczy prawie wyłącznie jego podtypu pęcherzykowego [20]. Mutacja *RAS* aktywuje ciągłą stymulację kilku dróg przewodzenia sygnałowego, przede wszystkim MAPK i PI3/AKT i jest wiązana – oprócz pęcherzykowego podtypu PTC – z większą skłonnością guzów do otorebkowania, mniej wyrażonymi cechami jądrowymi i mniejszą skłonnością do przerzutów w węzłach chłonnych [21].

Rearanżacja genu *NTRK1* kodującego błonowy receptor o aktywności kinazy tyrozynowej, nazywana rearanżacją TRK, jest obecna w < 5% PTC i jest mutacją zdolną aktywować szlak MAPK. Należy nadmienić, że zarówno gen *RET* jak i *NTRK1* nie wykazują ekspresji w zdrowych komórkach pęcherzykowych tarczycy.

3.5. Szlaki sygnałowe komórek i ich receptory.

Do każdej żywej komórki organizmu wielokomórkowego w jednostce czasu docierają liczne sygnały, zarówno z innych komórek (hormony, neuroprzekaźniki, czynniki wzrostu – lipidowe, peptydowe, różne substancje niskocząsteczkowe etc.), jak również ze środowiska (antygeny, substancje zapachowe, kwanty świetlne, bodźce termiczne, czuciowe). Komórki organizmu wielokomórkowego posiadają wiele złożonych mechanizmów komunikacji między sobą. Mechanizmy te ogólnie dzielimy na:

1. Autokrynnne – komórki wysyłają informacje do samych siebie (komunikacja autokrynnna).
2. Parakrynnne – komórki przekazują sygnały do komórek sąsiadujących (k. parakrynnna)
3. Endokrynnne – komórki przekazują sygnały do komórek oddalonych (k. endokrynnna)

Jak już wspomniano, do komórki w organizmie wielokomórkowym dociera olbrzymia liczba sygnałów [22]. Komórki mają za zadanie nie tylko sortowanie sygnałów na ważne i nieistotne, ale także wykrywanie słabych (ale istotnych). Pierwsze zadanie jest realizowane za pomocą receptorów z wysokim stopniem specyficzności, drugie przez receptory z wysokim powinowactwem, dodatkowo połączone z systemem wzmocnienia. Ponadto komórki mają za zadanie tłumaczenie różnorodnych sygnałów na prosty, uniwersalny „język” wewnątrzkomórkowy, co odbywa się przez aktywację szlaków sygnałowych związanych z ograniczoną liczbą procesów komórkowych. Komórki odpowiadają przez: zmiany metaboliczne, pobudzenie, wzrost, podziały, przez zaprogramowaną śmierć komórki [23], przez zmianę ekspresji genów [22].

Miejszem docelowym każdego sygnału docierającego do komórki jest receptor. Receptor, po związaniu z substancją sygnałową zwaną agonistą (najczęściej są to związki naturalne), może być pobudzony – dochodzi wtedy zazwyczaj do wiązania odwracalnego i do wewnątrzkomórkowej kaskady reakcji lub po związaniu z tzw. antagonistą (często związki syntetyczne) – hamowany (często wiązanie to bywa nieodwracalne). Agoniści i antagoniści wykazują z reguły duży stopień powinowactwa tzn. wiążą się specyficznie z receptorem w bardzo małych stężeniach.

Receptory z uwagi na ich lokalizację w komórce możemy podzielić na [22]:

-
1. Receptory błonowe,
 2. Receptory cytoplazmatyczne,
 3. Receptory jądrowe.

Pobudzenie (lub blokowanie) receptorów cytoplazmatycznych i jądrowych odbywa się za pomocą czynnika (liganda) przenikającego przez błonę komórkową, tzn. wykazującego właściwości hydrofobowe. Dzieje się tak m.in. w przypadku hormonów steroidowych (płciowych – progesteron, estradiol, testosteron, mineralokortykoidów – np. aldosteron, glukokortykoidów – np. kortyzol) oraz hormonów tarczycy i witaminy D. Receptory cytoplazmatyczne po związaniu z ligandem przemieszczają się do jądra gdzie inicjują transkrypcję (po związaniu się ze specyficzną sekwencją regulatorową DNA) i dalej translację. Obecnie wiadomo, że ten sam czynnik (ligand) może być wiązany przez różne rodzaje receptorów i uruchamiać odmienne szlaki sygnałowe [22].

3.6. Budowa receptorów błonowych, ze szczególnym uwzględnieniem receptorów kinaz tyrozynowych

Receptory błonowe są obecnie największą poznaną grupą receptorów uczestniczącą w przekazywaniu sygnałów komórkowych, stanowiąc równocześnie obszar intensywnych badań, zwłaszcza w kontekście wiązania i powinowactwa do różnych ligandów oraz efektów metabolicznych ich przyłączenia [24]. W błonach komórkowych rozmieszczonych jest wiele funkcjonalnie wszechstronnych receptorów. Co więcej, ich stan czynnościowy ulega zmianie w zależności od ich konfiguracji oraz dynamicznego rozmieszczenia w błonach komórkowych – receptor tego samego typu w różnych okolicznościach może wiązać ligand mocno, słabo lub nie wiązać się z nim w ogóle [25][26].

Wyróżniono cztery duże nadrodziny receptorów błonowych:

1. Receptory metabotropowe (sprzężone z białkami G)
2. Receptory jonotropowe (związane z kanałami jonowymi)
3. Receptory związane z kinazą tyrozynową
4. Receptory związane z kinazą serynowo-treoninową

Receptory metabotropowe sprzężone z białkami G (GPCR – ang. G-Protein Coupled Receptors) stanowią największą (ok. 1000) i najbardziej różnorodną grupę receptorów błonowych – w organizmie człowieka koduje je ok. 1% genów. Ich agonistami są związki hydrofilowe,

niektóre hormony i neuroprzekaźniki (np.; adrenalina - receptor β -adrenergiczny i noradrenalina) oraz nukleotydy. Receptory te reagują na bodźce fizyczne (czuciowe), jak i świetlne (receptor światła, rodopsyna). Wszystkie receptory GPCR mają niezależnie od funkcji ten sam plan budowy – są długimi pojedynczymi łańcuchami białkowymi, siedmiokrotnie przenikającymi błonę plazmatyczną.

Receptory jonotropowe są bezpośrednio połączone z kanałami jonowymi i – w przeciwieństwie do receptorów metabotropowych – nie są związane ze szlakami wtórnych przekaźników. Przez przyłączenie liganda do miejsca allosterycznego dochodzi do zmian konformacyjnych w rezultacie prowadzących do otwarcia kanału jonowego, umożliwiając napływ jonów (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ i Cl^-). Taki system komunikacji komórki jest możliwy przy działaniu niektórych hormonów i neuroprzekaźników (acetylocholina, serotonina, kwas γ -aminomasłowy). Proces ten jest o wiele szybszy niż sygnalizacja z udziałem receptorów metabotropowych. Jako taki musi być precyzyjnie regulowany, a receptory jonotropowe biorące w nim udział mają budowę bardziej skomplikowaną – składają się z wielu podjednostek, z których każda może występować w wielu wariantach molekularnych oraz posiadają wiele miejsc, do których przyłączają się różne modulatory zapewniające precyzyjną regulację czasu otwarcia kanału.

Receptory jonotropowe, bezpośrednio związane z kanałem jonowym, przekazują sygnał w ciągu milisekund, receptory metabotropowe, związane z białkiem G, potrzebują sekund na wywołanie w komórce określonej odpowiedzi. Jeszcze wolniejsze są - opisane niżej - receptory związane z kinazami (3 i 4) - odpowiedź pobudzonego receptora osiąga szczyt w okresie kilku minut. Najwolniejsze są receptory wewnątrzkomórkowe (cytoplazmatyczne i jądrowe).

Receptory z wewnętrzną aktywnością kinaz (tyrozynowej i serynowo-treoninowej) charakteryzują się, podobnie jak nadrodziny innych receptorów, swoistym podobnym schematem budowy [22]. Ludzki genom koduje ok. 58 takich receptorów, które podzielono na 20 podrodzin [27].

Receptory z aktywnością kinazy tyrozynowej (RTK – ang. Receptor Tyrosine Kinase). Receptory te składają się z trzech domen:

1. domeny zewnętrznej (receptorowej) – zbudowanej z łańcucha polipeptydowego, wiążącej ligand.
2. domeny śródbłonowej – o strukturze α -helisy
3. domeny cytozolowej (katalitycznej) – również utworzonej przez łańcuch polipeptydowy, zawierającej integralnie sekwencję z aktywnością kinazy tyrozynowej (TKD – ang. tyrosine kinase domain).

Część zewnętrzna RTK jest umieszczona na zewnątrz błony cytoplazmatycznej (ektodomena), zawiera N-koniec białka receptorowego i odpowiedzialna jest za wiązanie liganda, który nie ma zdolności samodzielnego przenikania do komórki oraz także odpowiada za dimeryzację i oligomeryzację [28] receptorów (tworzenie kompleksów), zarówno homodimeryzację (w obrębie tej samej klasy receptora), jak i heterodimeryzację (pomiędzy poszczególnymi klasami jednej podrodziny, w tym przypadku podrodziny HER). Budowa ektodomeny różni się pomiędzy poszczególnymi podrodzinami receptorów, co warunkuje wysoką specyficzność receptora, zabezpiecza przed niechcianą amplifikacją sygnału i zwiększa sygnałową precyzję [27]. Zewnętrzna domena EGFR/HER1 składa się z ok. 600 reszt aminokwasowych, zawiera N-koniec białka receptorowego i można w niej wyróżnić 4 podjednostki - I i III zwarte, wykazujące pofałdowanie β -helisy oraz podjednostki II i IV wydłużone, bogate w cysteinę. Przyłączenie EGF powoduje zmiany konformacyjne w obrębie monomeru EGFR, które prowadzą w rezultacie do połączenia z drugim monomerem EGFR (homodimeryzacja) i wytworzeniem kompleksu EGFR. Nadmienić należy, że przyłączenie liganda nie następuje w miejscu połączenia dwóch monomerów, ale w miejscu oddzielnym specjalnie do tego wyznaczonym (w obrębie domen I i II, z N-końcem). Połączenie (dimeryzacja) dwóch receptorów odbywa się głównie w obrębie ich domen zewnętrznych w częściach bogatych w cysteinę (głównie za pośrednictwem domeny II [28]) – za pomocą sztywnej „wystającej” pętli w kierunku jej odpowiednika w drugim monomerze (tzw. ramię dimeryzujące), co powoduje stabilizację kompleksu receptorowego – przez oddziaływanie sił elektostatycznych [27][29]. Przyłączenie liganda powoduje rotację o $\sim 130^\circ$ podjednostki I i II, zachowując względnie położenie podjednostki III i IV [28]. Domeny zewnętrzne są miejscem docelowym terapii przeciwnowotworowych opartych na humanizowanych monoklonalnych przeciwciałach [30] – np. anty-ErbB2 - trastuzumab (Herceptin) w raku piersi, anty-EGFR - cetuximab (Erbix) w raku jelita grubego [30]. Ponadto nadmienić należy, że domeny zewnętrzne receptorów grupy HER są mocno uglikozylowane, co ma istotne znaczenie dla ich dojrzewania i przemieszczania się na powierzchnię komórki [28][31].

Domena śródbłonowa RTK (transbłonowa) – o strukturze pojedynczej α helisy, łączy domenę zewnętrzną i wewnętrzną. Część wewnętrzna RTK (cytozolowa) – znajduje się po wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej, zbudowana jest z elementu podbłonowego (ang. juxtamembrane domain - JM), sąsiadującego z błoną, części o aktywności kinazy tyrozynowej oraz końca C-terminalnego. JM zawiera ok. 50 aminokwasów [32], jest miejscem oddziaływania receptora z hamującymi zwrotnie jego aktywność kinazami (PKC – kinazę białkową C, ERK/MAP – kinaza regulowana przez sygnały zewnątrzkomórkowe z grupy kinaz aktywowanych mitogenami) oraz

prawdopodobnie jest miejscem wiązania białka G [32]. Część podbłonowa odgrywa najprawdopodobniej kluczową rolę w fosforylacji części C-terminalnej oraz aktywacji kinazy [28]. Część wykazująca aktywność kinazy tyrozynowej (domena SH1 – Src homology 1, Src homology domain) zbudowana jest z około 250 reszt aminokwasowych. Trzecia część - C-terminalna zbudowana jest z ok. 229 reszt aminokwasowych, zawiera miejsca autofosforylacji, transfosforylacji, internalizacji, posiada miejsca aktywacji degradacji proteolitycznej białka receptorowego oraz – co należy podkreślić - posiada funkcję hamowania własnego receptora (autoinhibicji) – bez jej autofosforylacji lub bez jej usunięcia nie ma możliwości aktywności kinazowej receptora [32]. Miejsca wiązania ATP w domenie C-terminalnej katalizują przeniesienie reszty fosforanowej z ATP na własną cząsteczkę (autofosforylacja) lub inne białko (transfosforylacja).

Należy jeszcze raz zaznaczyć że budowa domen wewnętrznych kinaz tyrozynowych jest w istocie podobna, różnią się one jednak między sobą istotnie budową domen zewnętrznych odpowiedzialnych za kontakt z ligandami [27].

3.7. Omówienie receptorów rodziny Erb (HER).

Rodzina ta składa się z czterech receptorów błonowych o aktywności kinazy tyrozynowej typu I: ErbB1 (EGFR/HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) i ErbB4 (HER4). Białka te zawierają pozakomórkową domenę wiążącą ligand, hydrofobowy komponent przezbłonowy oraz domenę wewnątrzkomórkową o aktywności kinazy tyrozynowej. Receptory z rodziny HER uczestniczą w regulacji proliferacji, przeżycia, migracji, inwazyjności, angiogenezy oraz w procesie różnicowania komórek. Ludzki receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR, znany też jako HER1 lub ErbB1) był pierwszym receptorem błonowym komórki odkrytym i uznanym jako onkogen [33]. Został opisany przez Stanleya Cohena i Ritę Levi-Montalcini, za co otrzymali w 1986 roku nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny [34]. Kolejno opisano receptory tej rodziny: HER2 (znany również jako *neu oncogene*), HER3 oraz HER4. Grupa tych receptorów kontroluje m.in. wzrost i różnicowanie komórek, wywołuje mocną odpowiedź mitogenną, a zaburzenia genetyczne tych receptorów są jednym z najbardziej rozpowszechnionych defektów komórek nowotworowych [35]. Co najmniej 30% raków gruczołu piersiowego [36], 60% raków niedrobnokomórkowych płuc [37] oraz 40% glejaków [38] wykazuje nadekspresję albo zawiera aktywne mutacje receptorów grupy ErbB [29]. Mimo tego, że wszystkie te receptory tworzą jedną rodzinę, różnią się między sobą mechanizmem aktywacji. Na poszczególnych etapach ewolucji doszło do zaburzeń genetycznych (duplikacji genów kodujących [39] prowadzących do

nieprawidłowości budowy białek receptorowych, co obserwujemy w grupie HER – HER2 utracił zdolność wiązania się z ligandem i funkcjonuje głównie przez tworzenie heterodimerów z innymi receptorami tej grupy [40]. HER3 wykazuje upośledzoną aktywność kinazy tyrozynowej [41], nie ma zdolności homodimeryzacji i wymaga do sprawnego działania heterodimeryzacji [42]. Uaktywnienie szlaku sygnałowego przez grupę ErbB/HER jest początkiem kaskad przekazywania sygnałów głównie RAF/MEK/MAPK lub PI3K/AKT i JNK, co prowadzi w rezultacie do syntezy DNA i proliferacji komórek.

3.8. Model aktywacji receptorów kinaz tyrozynowych.

Efekty sygnalizacji rodziny HER zależą od kooperacji pomiędzy receptorami, modulacji przez kinazy innych receptorów i wpływu integryn oraz interakcji między innymi przekaźnikami. Istotnym mechanizmem kontroli działania sieci receptorów HER jest kompartmentalizacja komórkowa. Na przykład, zinternalizowany receptor w kompartmentcie wewnątrzkomórkowym może oddziaływać na efekторы i aktywować szlaki sygnalizacyjne inne, niż działając z lokalizacji błonowej. Może też potencjalnie pełnić funkcje zbliżone do czynników transkrypcyjnych. Podstawowym mechanizmem aktywacji receptorów grupy ErbB/HER jest tworzenie dimerów i wysokouporządkowanych oligomerów [43][44][45]. Przyłączenie liganda do zewnątrzkomórkowej części receptora zapoczątkowuje proces dimeryzacji, m.in. przez efekt masy co jest istotnym mechanizmem rozwoju nowotworu. Proces heterodimeryzacji pomiędzy poszczególnymi receptorami ErbB/HER jest szczególnie istotny dla aktywacji HER3, z uwagi na uszkodzenie aktywności kinazowej tego receptora. HER2 z kolei, mimo nieuszkodzonej aktywności kinazy, w normalnych warunkach nie tworzy homodimerów (nie ma też zdolności łączenia się z ligandem), aby być aktywowanym potrzebuje przyłączenia do receptora mającego zdolność wiązania liganda, do tego celu używa HER3. HER4 nie tworzy homodimerów i przekazuje sygnał aktywacji z błony komórkowej do wewnątrz komórki, ale po przyłączeniu liganda jego domena o aktywności kinazy ulega oderwaniu od reszty receptora i przemieszcza się w głąb cytoplazmy. Dokonują tego proteazy związane z błoną komórkową [46]. Domena zewnętrzna receptorów ErbB/HER przyjmuje jedynie dwie określone struktury przestrzenne, które m.in. warunkują zdolność do tworzenia dimerów [47]. Pierwsza z nich to struktura nazwana „rozwinęta” („extended”), w której element odpowiedzialny za łączenie się z dimerem (w obrębie podjednostki II tzw. „ramię dimeryzujące”) jest aktywny, druga forma „zwinęta” w której podjednostka II jest zamknięta w monomerze. Te dwa układy przestrzenne są m. in. skutkiem aktywności autoinhibycyjnej podjednostki IV, której usunięcie powoduje uaktywnienie ramienia

dimeryzującego [48]. Przyłączenie liganda powoduje, jak wspomniano wyżej, duże zmiany konformacyjne, rotacje o $\sim 130^\circ$ podjednostek I i II, przy względnym zachowaniu położenia podjednostek III i IV i przekształcenie części zewnętrznej na formę aktywną („extended”) gotową do tworzenia dimeru. Należy zaznaczyć, że powierzchnia połączenia dimeru jest w całości utworzona przez receptor – ligand jest z nim połączony na zewnątrz, poza tą powierzchnią [28]. Struktura przestrzenna części zewnętrznej ErbB2/HER2 jest „rozwinięta” na stałe przez brak autoinhibicyjnej funkcji podjednostki IV [28] i nie ma ona zdolności tworzenia homodimerów, prawdopodobnie na skutek innych dyskretnych różnic strukturalnych w porównaniu do rozwiniętej formy EGFR/HER1. Struktura heterodimeru zawierającego ErbB2/HER2 na obecnym etapie wiedzy nie jest znana [28].

Drugim ważnym elementem działania receptorów grupy HER jest możliwość tworzenia tzw. asymetrycznych dimerów przez połączenia w obrębie domen kinazowych [49]. W obrębie części wewnętrznej (cytozolowej) receptora, w domenie kinazowej istnieją dwa kluczowe elementy strukturalne, warunkujące możliwość połączeń na ich poziomie, są to: tzw. ramię aktywacyjne („activation loop”) z ustaloną sekwencją trzech aminokwasów (kwasu asparaginowego, fenyloalaniny i glicyny) oraz helisa αC – obie składowe pełnią rolę regulatorową i decydują o gotowości tej części do tworzenia dimeru. Co więcej, wykazano że do aktywacji części kinazowej nie jest konieczna fosforylacja reszt tyrozynowych w pętli aktywacyjnej [50][51], podobnie tworzenie dimeru na poziomie części kinazowych nie wymaga transfosforylacji (jak wcześniej uważano), a odbywa się w mechanizmie allosterycznym, w którym domeny kinazowe dwóch receptorów HER (aktywator i odbiorca) asymetrycznie ze sobą oddziałują, tworząc niesymetryczny dimer [52]. Odkrycie niesymetrycznych dimerów powstających na drodze mechanizmu allosterycznego protein doprowadziło do zrozumienia sposobu działania uszkodzonej domeny kinazowej HER3, która posiada zdolności aktywowania innych heterodimerów, zwłaszcza HER2. Ustalona sekwencja reszt aminokwasowych w końcu C (ang. C-lobe, aktywator) koresponduje do sekwencji w podobnych lokalizacjach innych członków rodziny HER, natomiast sekwencja w końcu N (ang. N-lobe, odbiorca) jest inna. Ostatecznie wykazano, że oddziaływanie allosteryczne pomiędzy białkami kinaz i ich następstwo, w postaci zmian konformacyjnych, jest podstawą tworzenia niesymetrycznych dimerów (np. HER2-HER3) na poziomie kinaz i nie wymaga fosforylacji tyrozynowej pętli aktywacyjnej [53]. Wykazano, że zarówno HER4 jak i HER2 tworzą asymetryczne (allosteryczne) dimery na poziomie domen kinazowych [54][55]. Zainteresowanie domeną kinazy EGFR i HER2 istotnie wzrosło po odkryciu onkogennej mutacji w jej obrębie, najczęstszą mutacją okazała się mutacja w obrębie pętli aktywacyjnej – L834R

[56][57]. Wykazano, że zmutowana forma L834R utrzymuje kinazę w nieodwracalnej aktywnej konfiguracji, która między innymi powoduje zwiększoną wrażliwość enzymu na inhibitory kinaz tyrozynowych [58], takich jak gefitinib i erlotinib – stosowanych od niedawna w onkologii. Znana jest również wtórna mutacja powodująca oporność na inhibitory kinaz – T766M [59]. Dokładne poznanie struktury domeny kinazowej, jak opisano wyżej, ma istotne znaczenie dla poznania onkogenezy nowotworów oraz umożliwia stosowanie coraz bardziej precyzyjnych leków przeciwnowotworowych, wykorzystujących onkogenny charakter zmutowanych form receptorów. Należałoby jeszcze pokrótce wspomnieć o autoinhibycyjnym charakterze segmentu podbłonowego (JM), który w postaci nieufosforowanej reaguje z helisą α C kinazy i utrzymuje nieaktywną jej formę [60]. Metodami „*in vitro*” wykazano, że rejon podbłonowy powoduje dimeryzację i aktywuje domenę kinazową EGFR [61]. Zmutowane formy JM upośledzają aktywację EGFR [62]. Element śródbłonowy również odgrywa znaczącą rolę - wg niektórych badaczy - w tworzeniu dimeru - połączenie N-końców i C-końców powoduje powstanie również połączenia pomiędzy helisami śródbłonowymi [63].

Podsumowując za Endresem i Arkhipovem [64][65] powstanie przestrzennej struktury domeny zewnętrznej związanej z ligandem wywołuje dimeryzację części śródbłonowych (α helis), blisko ich końców N-terminalnych, dimeryzację segmentów podbłonowych oraz wytworzenie asymetrycznych dimerów kinazowych (aktywnych). W dimerach pozbawionych liganda domeny zewnętrzne faworyzują połączenie C-końców helis śródbłonowych, rozdzielenie segmentów podbłonowych i powstanie symetrycznego nieaktywnego dimeru kinaz. Analizy monomerów i dimerów EGFR wykazały, że EGFR może istnieć w postaci dimeru pozbawionego liganda – jego przyłączenie powoduje rotację segmentu przezbłonowego, JM oraz w konsekwencji reorientację części cytoplazmatycznej i powstanie asymetrycznego aktywnego dimeru kinazowego [66]. Wykazano ponadto, że najprawdopodobniej dopiero kilka mutacji może doprowadzić do uszkodzenia połączenia przezbłonowego [64].

Podsumowując: klasyczny model niepołączonego z ligandem monomeru i jego przekształcenie w dimer po połączeniu z ligandem, jest – na podstawie ostatnich doniesień - zbyt uproszczony. Przyjmuje się obecnie, że EGFR występuje w postaci monomeru, pozostającego w równowadze z pozbawionym liganda dimerem (nieaktywnym) [28].

4. UZASADNIENIE WYBORU TEMATU

Receptory nabłonkowych czynników wzrostu wykazujące aktywność kinaz tyrozynowych stały się przedmiotem licznych prac naukowych, a ich odkrycie w określonych nowotworach (rak piersi,

gruczolakorak żołądka, jelita grubego czy płuc) dostarczyło dodatkowy czynnik predykcyjny i umożliwiło zastosowanie celowanej terapii przeciwnowotworowej, w oparciu o przeciwciała monoklonalne i inhibitory drobnocząsteczkowe [67]. Ponadto należy nadmienić, że odkryte w ostatnich dekadach zaburzenia genetyczne w PTC, takie jak: *BRAF/V600E*, *RET/PTC*, *RAS*, *TRK* są związane z zaburzeniami szlaków przewodnictwa sygnałowego wewnątrzkomórkowego (MAPK, PI3K/AKT, PI3K/PTEN/AKT) oraz w większości z nieprawidłowościami struktury białek o aktywności kinaz, w tym także będących receptorami.

Temat ekspresji receptorów o aktywności kinaz tyrozynowych, do których zalicza się rodzina receptorów ErbB/HER, w rakach brodawkowatych tarczycy (Papillary Thyroid Carcinoma – PTC) jest mniej znany, a literatura nie zawiera tak wielu prac temu tematowi poświęconych jak np. w raku piersi. Co więcej, nie jest do końca poznana rola receptorów rodziny HER w TC, nie jest w pełni znane ich powiązanie z poszczególnymi cechami patomorfologicznymi i klinicznymi w przypadku PTC. Poszukiwanie dodatkowych czynników prognostycznych jest szczególnie istotne dla wykrywanych coraz częściej mikroognisk raka brodawkowego tarczycy (PMC), dla których nie można zastosować czynników prognostycznych związanych z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego PTC, takich jak: średnica guza, pozatarczycowe szerzenie się, obecność przerzutów w węzłach chłonnych. Powyższe stało się powodem wyboru przeze mnie tematu tej pracy.

5. CELE PRACY

Celem niniejszej pracy jest odpowiedź na następujące pytania:

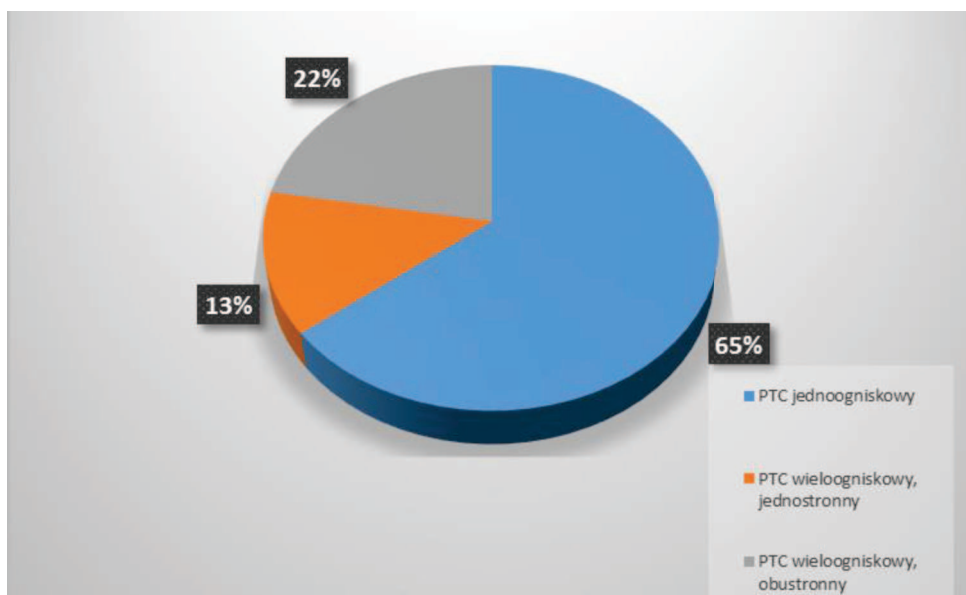
- 5.1. Czy w badanej grupie PTC obecna jest immunohistochemiczna ekspresja receptorów grupy ErbB/HER.
- 5.2. Czy w badanej grupie występuje zależność pomiędzy ekspresją receptorów ErbB/HER a wybranymi cechami patomorfologicznymi i klinicznymi.
- 5.3. Czy w badanej grupie obserwuje się zależność ekspresji immunohistochemicznej pomiędzy poszczególnymi receptorami grupy ErbB/HER.

6. MATERIAŁY I METODY

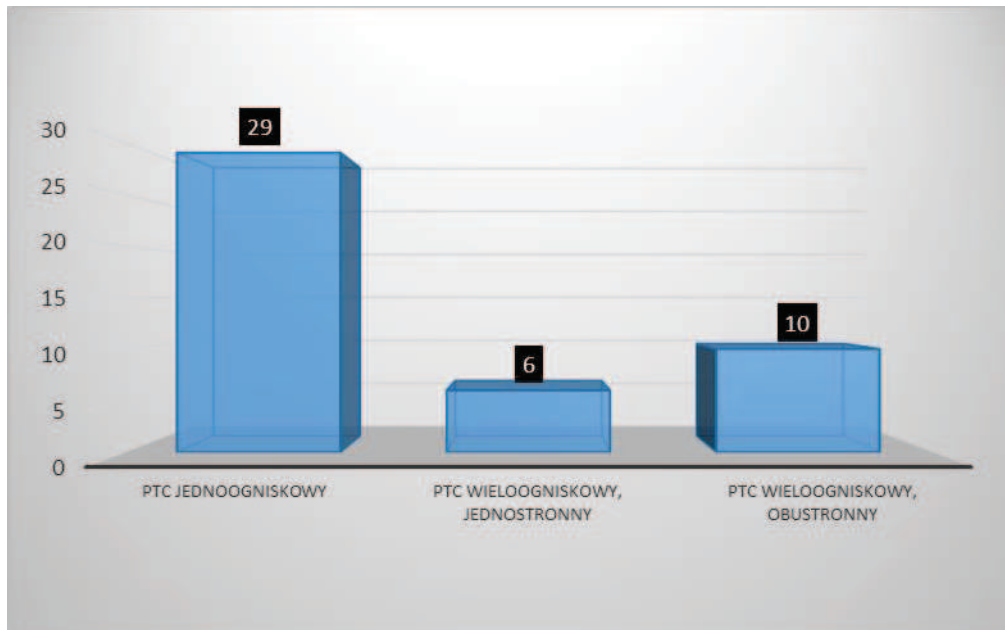
6.1. Charakterystyka grupy badanej

Badania przeprowadzono na archiwalnych przypadkach guzów tarczycy. Materiał tkankowy archiwizowany w blokach parafinowych w Zakładzie Patomorfologii pochodził od pacjentów Szpitala Św. Wojciecha w Gdańsku Zaspie Copernicus Podmiot Leczniczy Sp. z o.o., poddanych zabiegowi operacyjnemu w latach 1996-2002 z powodu TC. Do badań zakwalifikowano wyłącznie przypadki z rozpoznaniem pierwotnego PTC. Z badanej grupy wyłączono przypadki z rozpoznaniem brodawkowego guzka hyperplastycznego oraz innych nowotworów tarczycy – raka rdzeniastego (MTC) i pęcherzykowego (FTC), jak i nowotworów typu gruczolaka pęcherzykowego i kwasochłonnego. Po dokonaniu ponownej weryfikacji utworzono grupę 45 guzów z rozpoznaniem PTC, pochodzących od chorych w wieku od 17 do 82 lat (mediana – 50). Wśród nich było 41 (91,1%) kobiet i 4 (8,9%) mężczyzn. W grupie tej znalazło się 29 przypadków PTC jednoogniskowych - ognisko tylko w jednym płacie gruczołu tarczowego (64,4% przypadków) i 16 PTC wieloogniskowych (35,5%). Spośród PTC wieloogniskowych, 6 przypadków było zlokalizowanych w jednym płacie (13,3% wszystkich przypadków) oraz 10 w obu płatach (22,2%). Powyższe dane ilustruje Rycina 2 i Rycina 3:

Rycina 2. Liczba PTC jednoogniskowych, wieloogniskowych - jedno- i obustronnych



Rycina 3. Liczba PTC jednoogniskowych, wieloogniskowych - jedno- i obustronnych.



Stopień patomorfologicznego zaawansowania choroby nowotworowej (pTNM) oceniano w oparciu o skalę TNM zgodnie z 7 wydaniem AJCC/UICC TNM [68], wykorzystując dane z raportów histopatologicznych poszczególnych przypadków.

Guz pierwotny (pT)

pTX: Brak możliwości oceny

pT0: Brak obecności guza

pT1a: Wymiar guza do 1 cm ograniczony do tarczycy

pT1b Guz większy niż 1 cm i mniejszy niż 2 cm ograniczony do tarczycy

pT2: Guz większy niż 2 cm ale nie większy niż 4 cm i ograniczony do tarczycy

pT3: Guz większy niż 4 cm i ograniczony do tarczycy lub każdy guz z minimalnym naciekiem tkanek poza torebką tarczycy (np. naciek mięśnia mostkowo-tarczowego lub tkanek miękkich okołotarczycowych)

pT4a: Każdy guz przekraczający torebkę tarczycy i naciekający podskórne tkanki miękkie, krtani, tchawicę, przełyk lub nerwy krtaniowe wsteczne

pT4b: Guz naciekający powięź przedkręgosłupową lub tętnicę szyjną lub naczynia śródpiersia

Rak niezróżnicowany (anaplastyczny – ATC)

pT4a: ATC ograniczony do tarczycy usunięty operacyjnie

pT4b: ATC z naciekiem poza tarczycę nie usunięty radykalnie

Regionalne węzły chłonne (pN)

pNX: Brak możliwości oceny

pN0: Nie stwierdza się przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych

pN1a: Obecne przerzuty w grupie VI (przedtchawiczny, okołotchawiczny i przedkrtaniowy/delficki)

pN1b: Obecne przerzuty w węzłach szyjnych po stronie guza, obustronnie lub po drugiej stronie (grupy I,II,III,IV,V) lub zagardłowych lub w węzłach śródpiersiowych górnych (grupa VII).

Przerzuty odległe (pM)

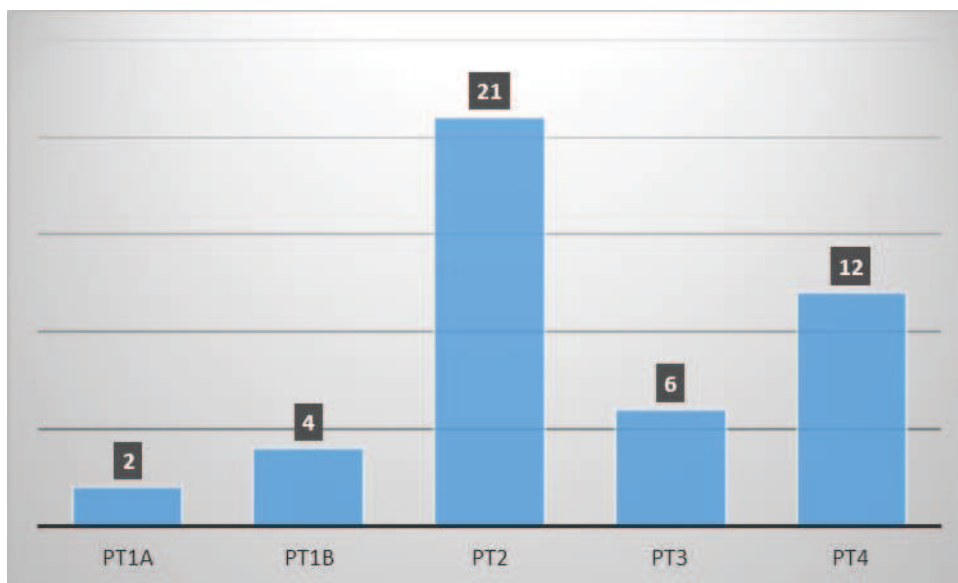
pMX: Brak możliwości oceny

pM1: Obecność przerzutów odległych

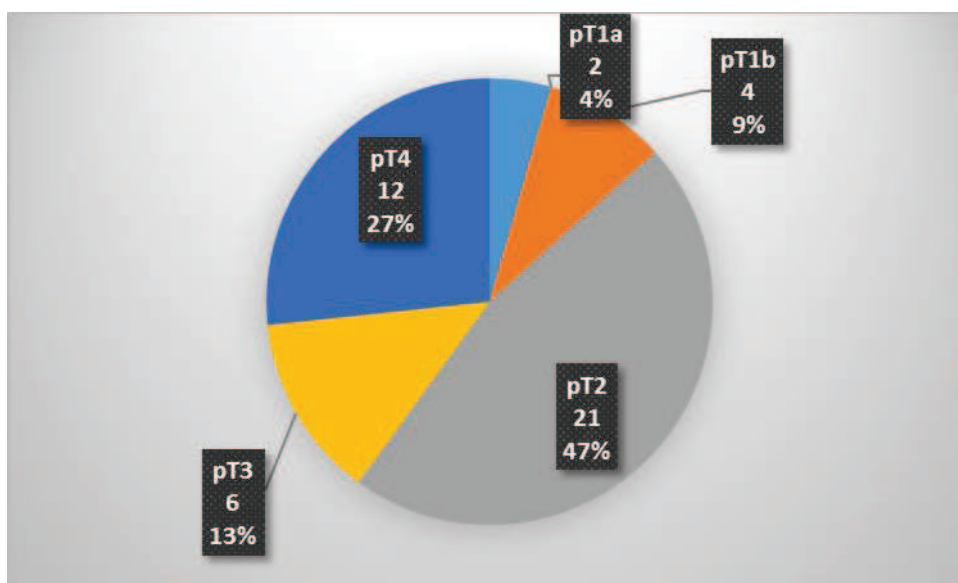
Zaawansowanie choroby nowotworowej, w badanej grupie przedstawiało się następująco:

1. Guz pierwotny (pT): pT1a – 2 przypadki (4,4%), pT1b – 4 przypadki (8,9%), pT2 – 21 przypadków (46,7%), pT3 – 6 przypadków (13,3%), pT4 – 12 przypadków (26,7%), co przedstawia Rycina 4 i 5.

Rycina 4. Porównanie liczby przypadków wg cechy pT

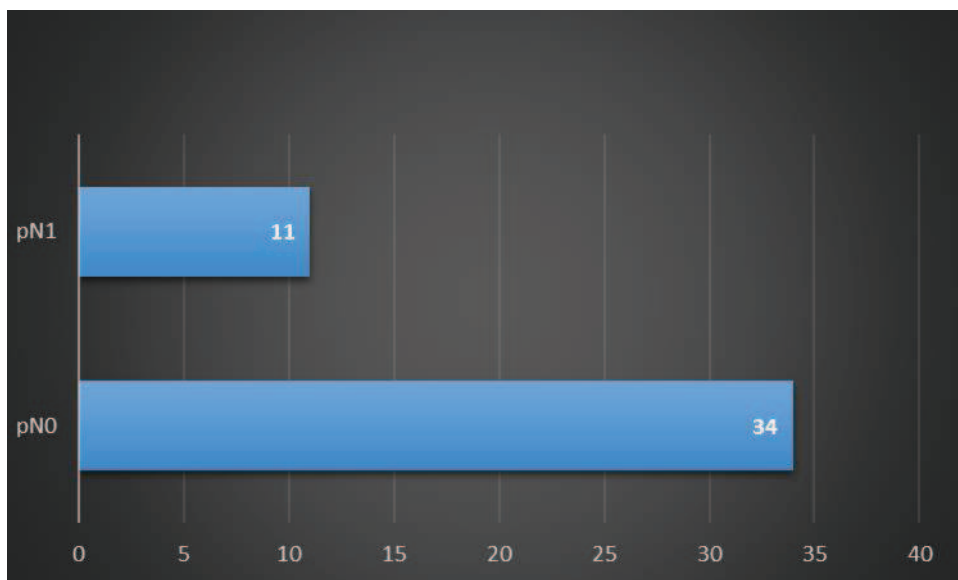


Rycina 5. Porównanie liczby przypadków wg cechy pT

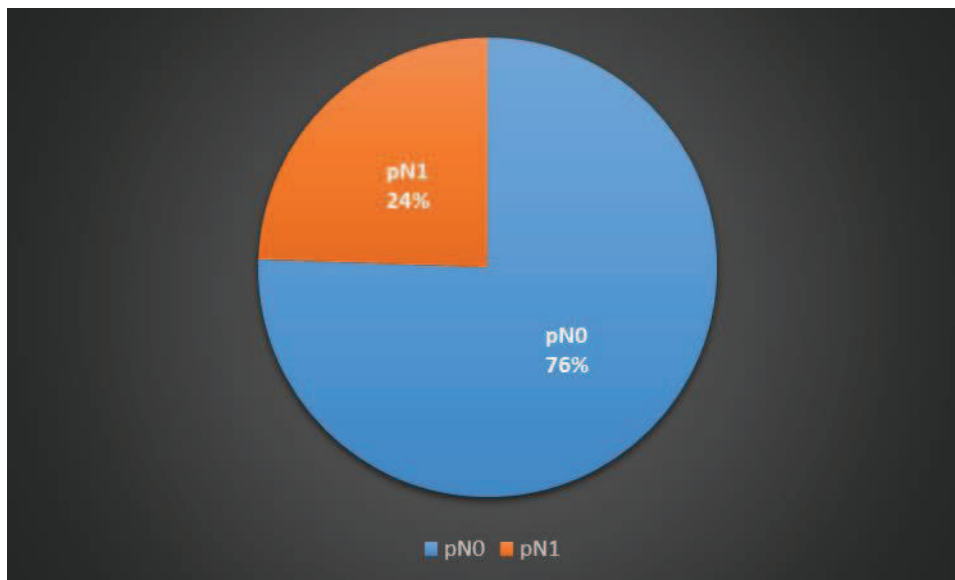


2. Regionalne węzły chłonne (pN): pN0 – 34 przypadki (75,6%), pN1 – 11 przypadków (24,4%), co przedstawia Rycina 6 i 7.

Rycina 6. Regionalne węzły chłonne - cecha pN



Rycina 7. Regionalne węzły chłonne - cecha pN



3. Przerzuty odległe (pM) – tylko w 1 przypadku stwierdzono przerzuty odległe (2,2%).

6.2. Charakterystyka grupy kontrolnej.

Grupę kontrolną stanowiły fragmenty mięszu tarczycy, pochodzące z niezmienionego drugiego płata gruczołu tarczowego tego samego chorego lub innego fragmentu mięszu tarczycy, o prawidłowej strukturze makro- i mikroskopowej (45 przypadków).

6.3. Materiał badawczy

W kolejnym etapie dokonano przeglądu preparatów histopatologicznych barwionych rutynowo hematoksyliną i eozyną (H-E) dotyczących poszczególnych 45 przypadków PTC, wybierając wycinki kwalifikujące się do badań i spełniające następujące kryteria:

- a. wycinek zawierający reprezentatywną dla danego rozpoznania tkankę nowotworową.
- b. wycinek pozbawiony zmian autolitycznych, zawierający dobrze zachowany nieskoagulowany materiał tkankowy
- c. wycinek zawierający wystarczającą ilość tkanki nowotworowej (tzn. minimum 0,5cm²).
- d. w przypadku grupy kontrolnej wybierano wycinki zawierające zdrową niezmienioną tkankę gruczołową tarczycy, bez cech nasilonego zapalenia i morfologicznych wykładników zaburzeń czynnościowych.

Do wyselekcjonowanych preparatów H-E, zawierających reprezentatywną do badań tkankę, dopasowano odpowiednie bloki parafinowe wykonane rutynową procedurą patomorfologiczną (utrwalenie nadesłanego preparatu w 4% zbuforowanym roztworze formaldehydu, pobranie podczas opracowania makroskopowego reprezentatywnych wycinków, kolejne utrwalanie w ww formaldehydzie, płukanie w wodzie, przeprowadzanie przez odczynniki: alkohol absolutny – 6h, ksylen – 3h, zatopienie w niskotopliwej parafinie). Z tak przygotowanych bloków parafinowych krojono (mikrotom saneczkowy) skrawki grub. 3µm (3 mikrometrów = 3 mikronów) przeznaczone do dalszych badań odczynów immunohistochemicznych (IHC).

6.4. Odczyny immunohistochemiczne i metody ich oceny

Przeciwciała użyte do oceny IHC:

- a. przeciwciało anty-EGFR/HER1 (klon 5B7) - Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd, nr kat 05278457001 – rozcieńczone, monoklonalne, p-ciało królicze, skierowane na wewnętrzną domenę ludzkiego EGFR.

- b. przeciwciało anty-HER2, PATHWAY HER2/neu (klon 4B5) - Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd, nr kat 5278368001 - rozcieńczone, monoklonalne, p-ciało królicze, skierowane przeciwko wewnętrznej domenie onkoproteiny c-ErbB2 (HER2).
- c. przeciwciało anty-HER3 (klon DAK-H3-IC) - Dako, nr kat M7297 – stężone monoklonalne p-ciało mysie, skierowane przeciw domenie wewnętrznej HER3.
- d. przeciwciało anty-ErbB4/HER4 (klon HFR-1) - Abcam, nr kat AB19391 – stężone monoklonalne p-ciało mysie.

Wszystkie wykonane odczyny IHC wykonano metodą automatyczną przy użyciu aparatu Benchmark Classic.

Poniżej przedstawiono szczegóły barwień specjalnych dla poszczególnych p-ciał:

- a. anty-EGFR/HER1 (klon 5B7) - do odsłaniania antygeny zastosowano bufor CC1 (Cell Conditioner 1 pH 8-8,5; Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd, nr kat 05279801001), czas inkubacji dla przeciwciała pierwotnego wynosił 20 minut. Zastosowano multimerowy zestaw detekcyjny ultraView DAB Universal Detection Kit (Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd, nr kat 05269806001).
- b. anty-HER2, PATHWAY HER2/neu (klon 4B5) - do odsłaniania antygeny zastosowano bufor CC1 (Cell Conditioner 1 pH 8-8,5; Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd, nr kat 05279801001), czas inkubacji dla przeciwciała pierwotnego wynosił 20 minut. Zastosowano multimerowy zestaw detekcyjny ultraView DAB Universal Detection Kit (Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd, nr kat 05269806001).
- c. anty-HER3 (klon DAK-H3-IC) - przeciwciało rozcieńczono 1:100 za pomocą Antibody Diluent (Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd, nr kat 05261899001). Do odsłaniania antygeny zastosowano bufor CC1 (Cell Conditioner 1 pH 8-8,5; Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd, nr kat 05279801001), czas inkubacji dla przeciwciała pierwotnego wynosił 32 minuty. Zastosowano multimerowy zestaw detekcyjny ultraView DAB Universal Detection Kit (Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd, nr kat 05269806001).
- d. anty-ErbB4/HER4 (klon HFR-1) – przeciwciało rozcieńczono 1:100 za pomocą Antibody Diluent (Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd, nr kat 05261899001). Do odsłaniania antygeny zastosowano bufor CC1/CC2/enzym Protease 1* (Cell Conditioner 1 pH 8-8,5; Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd), czas inkubacji dla przeciwciała

pierwotnego wynosił 32 minuty. Zastosowano multimerowy zestaw detekcyjny ultraView DAB Universal Detection Kit (Ventana Medical Systems/Roche Diagnostics Ltd, nr kat 05269806001).

Kontrolę negatywną wykonano wykorzystując ww metodę automatyczną, stosując w miejsce przeciwciał pierwotnych roztwory surowicy od nieimmunizowanego zwierzęcia, odpowiednio królicze i mysie. Kontrolę pozytywną wykonano stosując tkanki referencyjne zalecane przez producentów p-ciał: anti-EGFR/HER1 (klon 5B7) – łożysko, anti-HER2 (klon4B5) – rak piersi, anti-HER3 (klon DAK-H3-IC) – śluzówka jelita grubego, anti-ErbB4/HER4 (klon HFR-1) – mięsień serca.

W wykonanych preparatach immunohistochemicznych dokonano półilościowej oceny ekspresji białek rodziny HER, biorąc pod uwagę obecność antygenu w błonie komórkowej (odczyn błonowy), w cytoplazmie (o. cytoplazmatyczny) oraz jądrze komórkowym (o. jądrowy).

Dla poszczególnych antygenów zastosowano następujące (różne) skale ocen:

6.4.1. EGFR (HER1)

EGFR - oceniano odczyn błonowy i cytoplazmatyczny (zarówno ich intensywność, jak i % komórek go wykazujących); odczynu jądrowego nie stwierdzono.

6.4.1.1. odczyn błonowy (intensywność odczynu i % komórek):

EGFR (HER1) - odczyn błonowy (intensywność odczynu)	ilościowe przedziały komórek wykazujących odczyn EGFR (% komórek wykazujących odczyn)
0 – brak odczynu	0-10%; 10-50%; 50-80%; 80-100%
1 – słabo nasilony	
2 – średnio nasilony	
3 – mocny odczyn	

6.4.1.2. odczyn cytoplazmatyczny (intensywność i % komórek)

EGFR (HER1) - odczyn cytoplazmatyczny (intensywność odczynu)	ilościowe przedziały komórek wykazujących odczyn EGFR (% komórek wykazujących odczyn)
0 – brak odczynu	0-10%; 10-50%; 50-80%; 80-100%
1 – słabo nasilony	
2 – średnio nasilony	

6.4.2. HER2

HER2 – oceniano odczyn błonowy i cytoplazmatyczny (zarówno ich intensywność jak i % komórek go wykazujących), odczynu jądrowego nie stwierdzono.

6.4.2.1. odczyn błonowy (intensywność i % komórek):

HER2 - odczyn błonowy (intensywność odczynu)	ilościowe przedziały komórek wykazujących odczyn HER2 (% komórek wykazujących odczyn)
0 – brak odczynu	0%; 1-10%; 10-40%; >40%;
1 – słabo nasilony	
2 – średnio nasilony	

6.4.2.2. odczyn cytoplazmatyczny (intensywność i % komórek):

HER2 - odczyn cytoplazmatyczny (intensywność odczynu)	ilościowe przedziały komórek wykazujących odczyn HER2 (% komórek wykazujących odczyn)
0 – brak odczynu	0%; 1-10%; 10-40%; >40%;
1 – słabo nasilony	
2 – średnio nasilony	

6.4.3. HER3

HER3 – poddano ocenie wyłącznie odczyn jądrowy (intensywność w skali dwustopniowej oraz % komórek go wykazujących), odczyn cytoplazmatyczny oraz błonowy nie został odnotowany.

6.4.3.1. odczyn jądrowy (intensywność i % komórek):

HER3 - odczyn jądrowy (intensywność odczynu)	ilościowe przedziały komórek wykazujących odczyn HER3 (% komórek wykazujących odczyn)
0 – brak odczynu	0%; 1-5%;
1 – obecny (słaby i średni)	

6.4.4. HER4

HER4 – poddano ocenie odczyn jądrowy i cytoplazmatyczny (zarówno ich intensywność jak i procent komórek wykazujących), odczyn błonowy nie ujawnił się.

6.4.4.1. odczyn jądrowy (intensywność i % komórek):

HER4 - odczyn jądrowy (intensywność odczynu)	ilościowe przedziały komórek wykazujących odczyn HER4 jądrowy (% komórek wykazujących odczyn)
0 – brak odczynu	<80%; 80-90%; >90%;
1 – odczyn obecny (słaby)	

6.4.4.2. odczyn cytoplazmatyczny (intensywność i % komórek):

HER4 - odczyn cytoplazmatyczny (intensywność odczynu)	ilościowe przedziały komórek wykazujących odczyn HER4 (% komórek wykazujących odczyn)
0 – brak odczynu	0%; >90%;

1 – słabo nasilony

6.5. Analiza statystyczna

Przed przystąpieniem do właściwej analizy przeprowadzono walidację danych. Sporządzono standardowe statystyki opisowe oraz oceniono zgodność rozkładów zmiennych o charakterze ciągłym z rozkładem normalnym (wzrokowa ocena histogramu i test Kołmogorowa-Smirnowa). Zmienne, których rozkład odbiegał znacznie od normalnego poddawano transformacji celem uwzględnienia ich w analizach parametrycznych.

Do charakterystyki odczynów IHC zastosowano wskaźnik "score", który integruje dwa niezależne od siebie parametry tj. intensywność odczynu oraz procent komórek z odczynem dodatnim. Wskaźnik ten obliczano wg następującego wzoru:

$$\text{Score} = \% \text{ komórek} \times \text{intensywność}$$

Gdzie % komórek przyjmował wartości od 0 do 100, a intensywność od 0 do 3.

Zatem score może przyjmować wartości od 0 do 300.

Wskaźnik posiada następujące cechy:

- przyjmuje wartość minimalną, tj. 0, gdy nie stwierdza się komórek z dodatnim odczynem IHC (tj. zerowa intensywność świecenia w komórkach)
- przyjmuje wartość maksymalną, tj. 300, gdy we wszystkich komórkach obserwuje się maksymalną intensywność
- przyjmuje wartości pomiędzy 0 a 300 w pozostałych sytuacjach, przy czym wartość ta jest pochodną liczby komórek z dodatnim odczynem oraz intensywności tych odczynów. Zastosowanie tego wskaźnika ułatwiło interpretację uzyskanych wyników.

Porównania pomiarów uzyskanych w tkankach zdrowych oraz tkankach nowotworowych dokonano przy użyciu testu U Manna-Whitneya.

Korelacje pomiędzy badanymi zmiennymi oceniano metodą Pearsona lub Spearmana. Zależności pomiędzy zmiennymi jakościowymi oceniano przy pomocy testu chi-kwadrat Pearsona (z poprawką Yatesa, jeśli zachodziła taka konieczność).

Za istotne statystycznie uznawano wyniki, dla których współczynnik p był mniejszy od 0.050. Ze względu na eksploracyjny charakter analizy (a nie confirmacyjny) nie stosowano poprawki na wielokrotne porównania.

Wszystkie operacje na danych oraz analizy statystyczne przeprowadzono przy pomocy komputera osobistego z zastosowaniem pakietu statystycznego STATA 13.1 firmy StataCorp LP (Stany Zjednoczone Ameryki Płn.).

7. WYNIKI

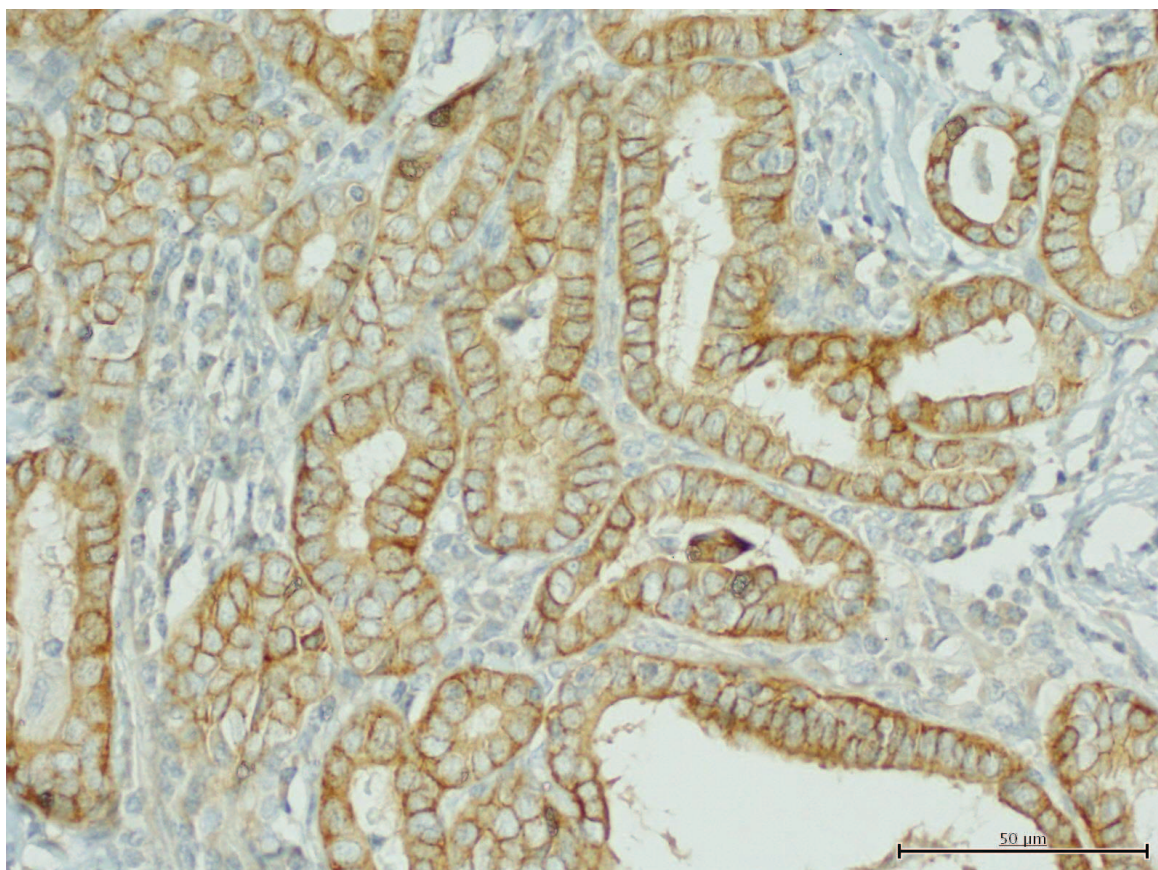
7.1. Ocena ekspresji badanych antygenów

7.1.1. Wyniki pomiarów IHC

7.1.1.1. ErbB1/EGFR/HER1

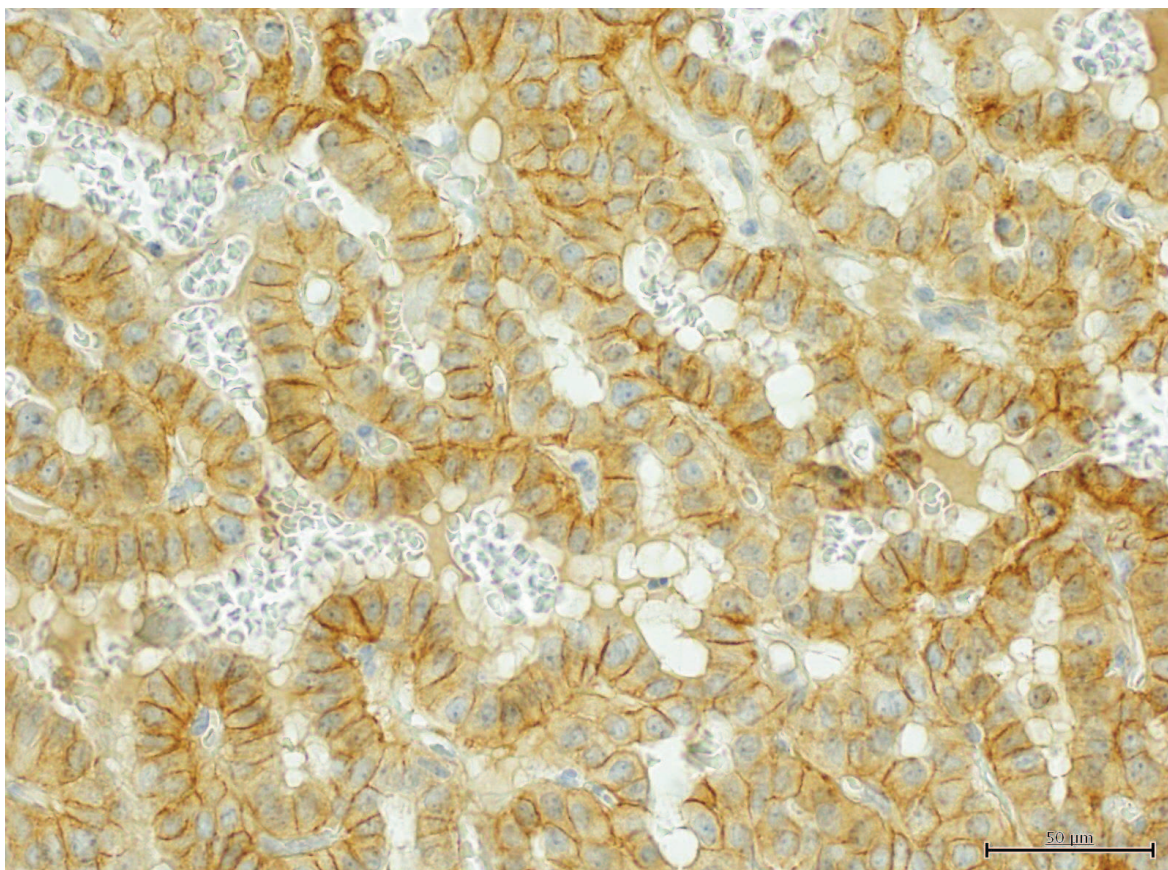
W zbadanym materiale stwierdzono ekspresję antygeny ErbB1 w lokalizacji błonowej w 44 na 45 przypadków (97,8%PTC). Większość tkanek PTC (27 z 45) wykazywało intensywność odczynu na poziomie 2 (Rycina 8), a w 82,3% próbek odsetek komórek wykazujących dodatnią reakcję IHC był większy od 50% (37 z 45).

Rycina 8. Ekspresja EGFR w PTC w lokalizacji błonowej na poziomie 2 (EGFR, x200)



Ekspresja ErbB1 w lokalizacji cytoplazmatycznej była dodatnia w 43 przypadkach (95,6% PTC), w większości (35 z 45) była na poziomie 1 (Rycina 9). W 72% próbkach co najmniej połowa komórek wykazywała reakcję pozytywną.

Rycina 9. Ekspresja EGFR w PTC w lokalizacji cytoplazmatycznej na poziomie 1 oraz w lokalizacji błonowej na poziomie 2 (EGFR, x200)



Uzyskane wyniki przedstawia Tabela 2.

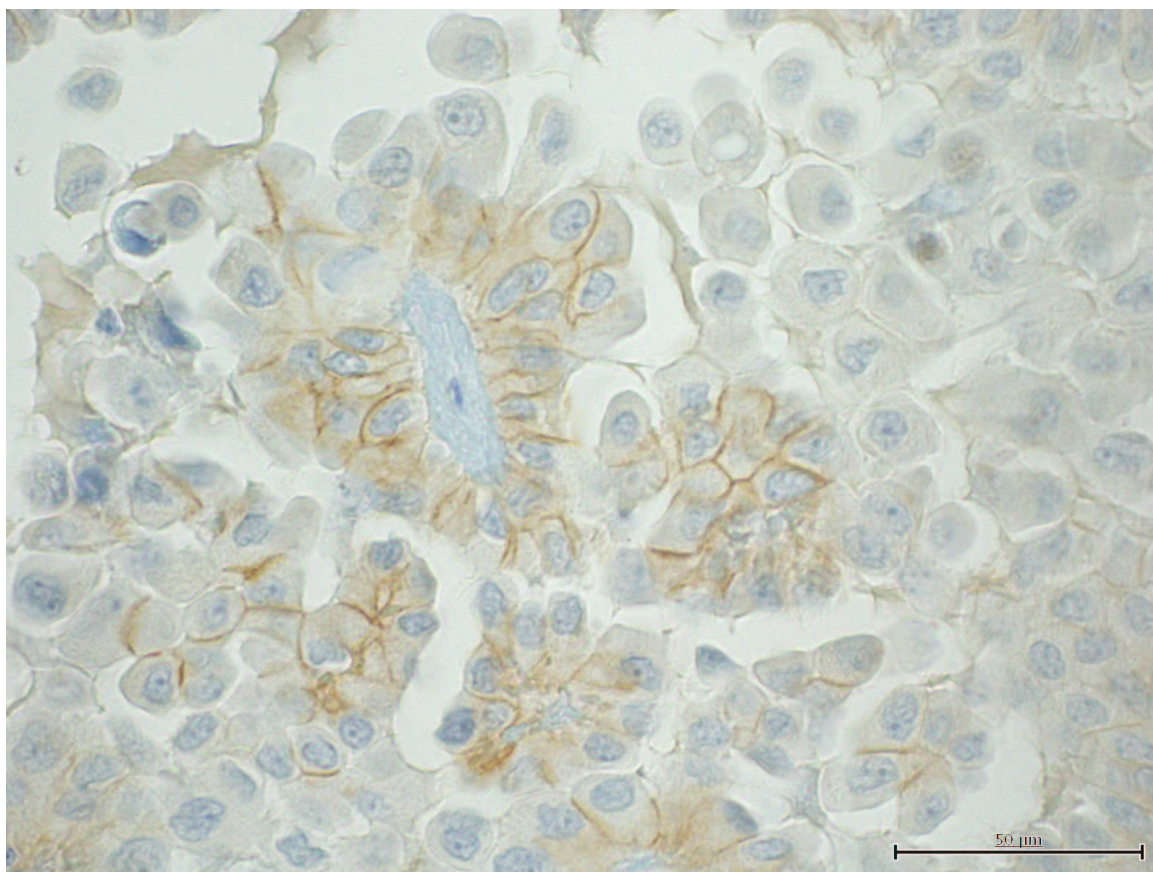
Tabela 2. Ekspresja antygenu ErbB1 w ocenie immunohistochemicznej.

Lokalizacja		Intensywność odczynu				Odsetek komórek z dodatnim odczynem			
		0	1	2	3	0-10%	10-50%	50-80%	80-100%
Błonowa	n	1	15	27	2	2	6	21	16
	%	2,2	33,3	60,0	4,4	4,4	13,3	46,7	35,6
cytoplazma- tyczna	n	2	35	8	-	4	9	10	22
	%	4,4	77,8	17,8	-	8,9	20,0	22,2	48,9

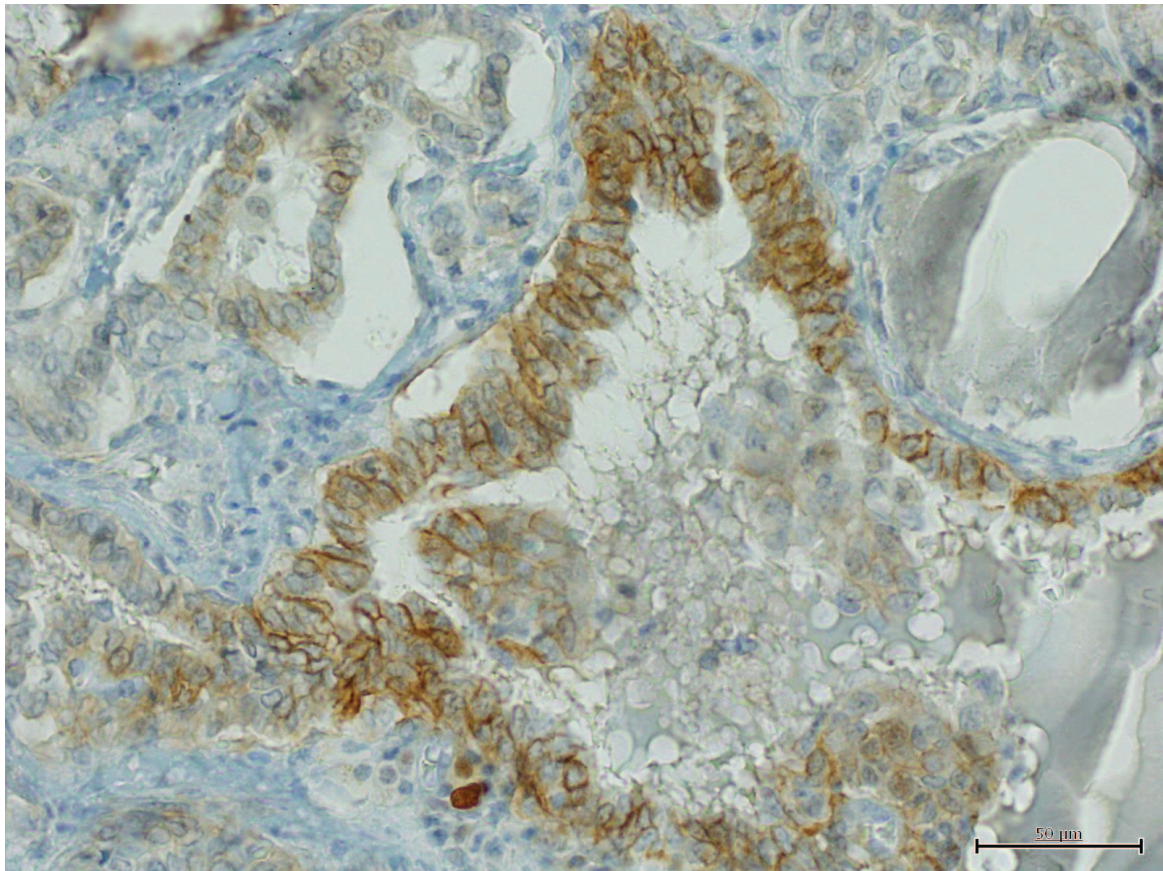
7.1.1.2. ErbB2/HER2

Wyniki oceny ekspresji antygenu ErbB2 przedstawiono w Tabeli 3. Stwierdzono słabą ekspresję antygenu w lokalizacji błonowej. Immunoreaktywność występowała w 86,7% próbek (39 guzów), w większości na poziomie 1 (Rycina 10), w mniejszej części na poziomie 2 (Rycina 11). Odsetek komórek z ekspresją ErbB2 nie przekraczał 40%.

Rycina 10. Ekspresja HER2 w PTC na poziomie 1 (HER2, x400)



Rycina 11. Ekspresja HER2 w lokalizacji błonowej na poziomie 2 (HER2, x200)



Ekspresja ErbB2 w lokalizacji cytoplazmatycznej była śladowa – w 68,9% próbek nie obserwowano żadnego mierzalnego odczynu, w pozostałej części intensywność była prawie wyłącznie na poziomie 1. Podobnie, odsetek komórek z dodatnim odczynem był niski. Tylko 31% komórek wykazywało cytoplazmatyczną ekspresję ErbB2 na poziomie 1 - 40% (Tabela 3).

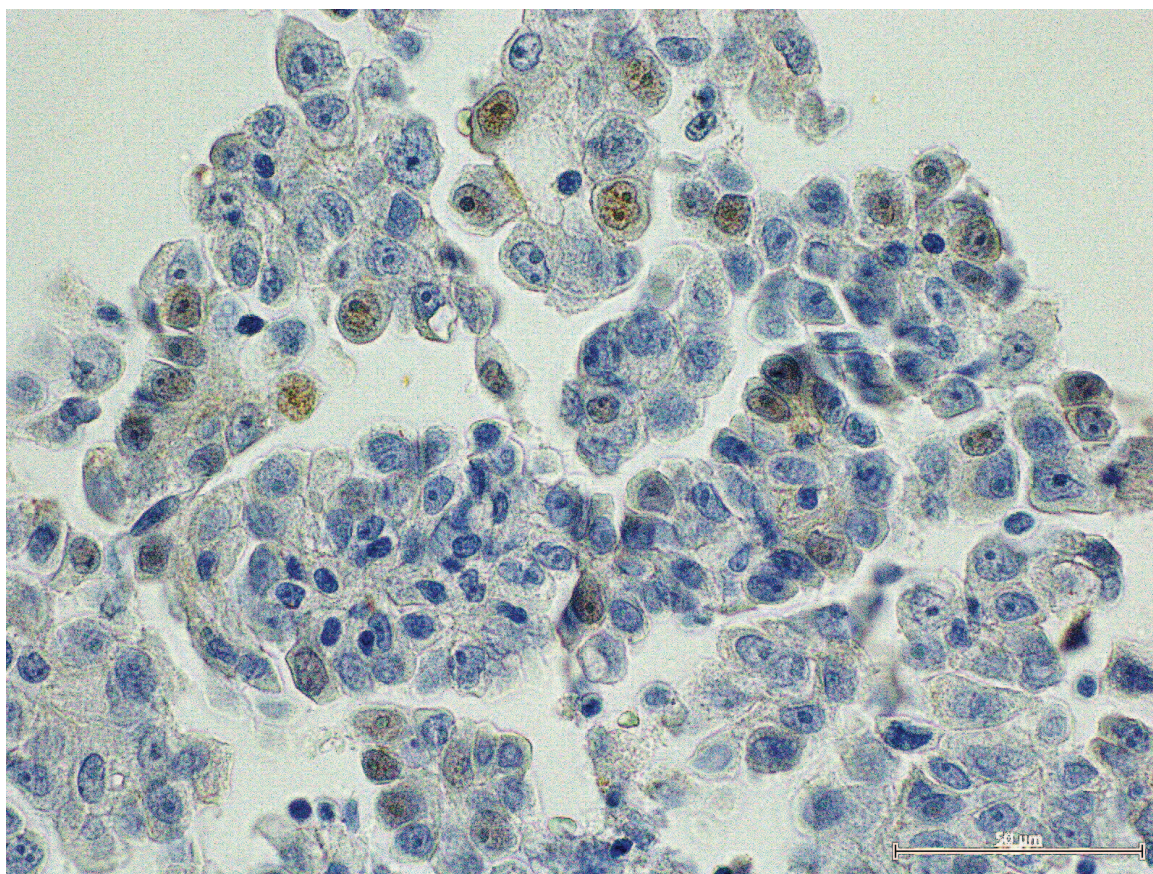
Tabela 3. Ekspresja antygenu ErbB2 w ocenie immunohistochemicznej.

Lokalizacja		Intensywność odczynu				Odsetek komórek z dodatnim odczynem			
		0	1	2	3	0	1-10%	10-40%	>40%
błonowa	n	6	31	8	-	6	18	21	-
	%	13,3	68,9	17,8	-	13,3	40,0	46,7	-
cytoplazmatyczna	n	31	12	1	1	31	6	8	-
	%	68,9	26,7	2,2	2,2	68,9	13,3	17,8	-

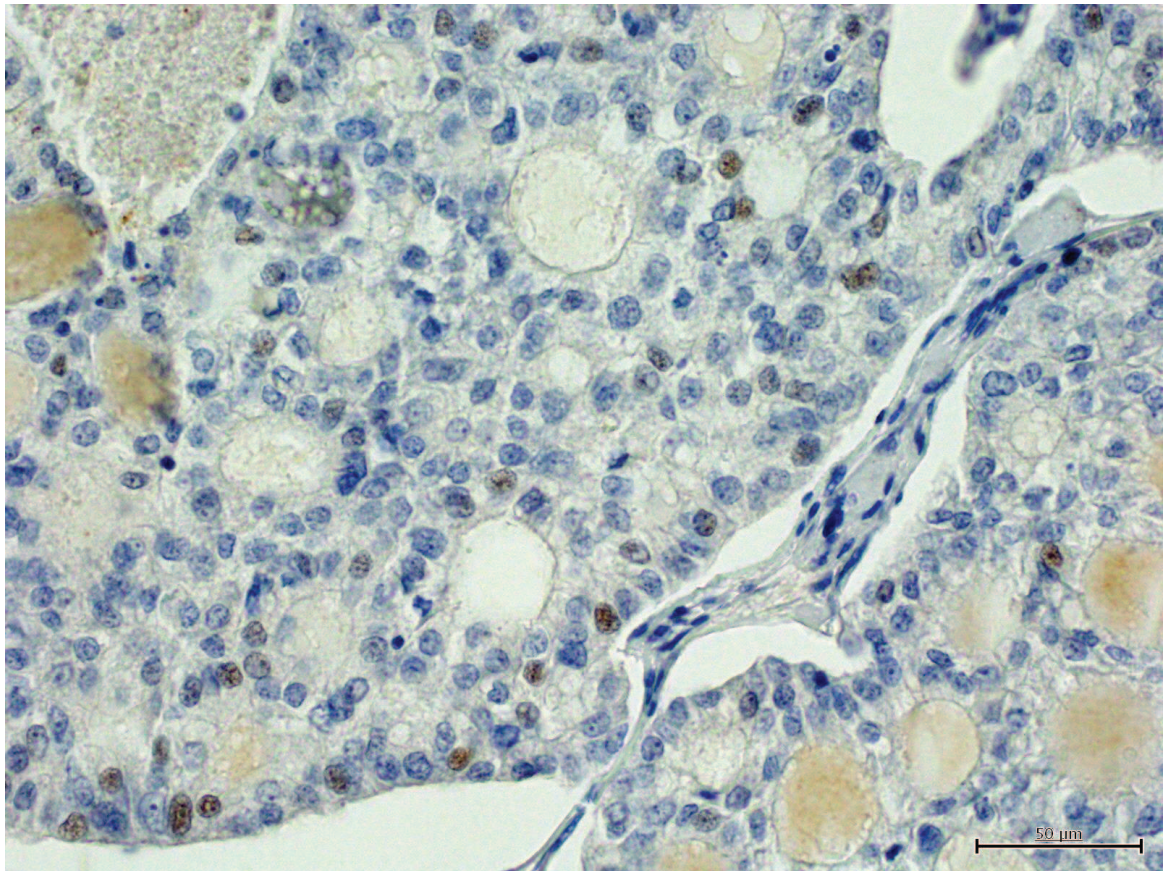
7.1.1.3. ErbB3/HER3

Wyniki oznaczeń ekspresji ErbB3 przedstawia Tabela 4. Wykazano słabą ekspresję antygenu ErbB3 w lokalizacji jądrowej. Dodatni odczyn wykazywało 86,7% przebadanych próbek (39), przy czym liczba komórek z odczynem dodatnim nie przekraczała na ogół 10%, a intensywność odczynu nie była większa niż 1 (Rycina 12 i 13).

Rycina 12. Ekspresja HER3 w lokalizacji jądrowej w PTC (HER3, x400)



Rycina 13. Ekspresja HER3 w lokalizacji jądrowej w PTC (HER3, x200)



Nie stwierdzono żadnej ekspresji ErbB3 w lokalizacji błonowej ani praktycznie w cytoplazmatycznej.

Tabela 4. Ekspresja antygenu ErbB3 w ocenie immunohistochemicznej.

Lokalizacja		Intensywność odczynu				Odsetek komórek z dodatnim odczynem			
		0	1	2	3	0-1%	1-10%	10-20%	20-30%
jądrowa	n	6	39	-	-	21	19	4	1
	%	13,3	86,7	-	-	46,7	42,2	8,9	2,2
błonowa	n	45	-	-	-	45	-	-	-
	%	100	-	-	-	100	-	-	-
cytoplazmatyczna	n	44	1	-	-	44	1	-	-
	%	97,8	2,2			97,8	2,2		

7.1.1.4. ErbB4/HER4

W przebadanym materiale stwierdzono umiarkowaną ekspresję antygenu ErbB4, zarówno w lokalizacji jądrowej, jak i cytoplazmatycznej (Rycina 14). We wszystkich przebadanych próbkach odczyn IHC był dodatni i w większości dotyczył co najmniej 90% komórek. Szczegóły przedstawia Tabela 5.

Rycina 14. Ekspresja HER4 w PTC w lokalizacji jądrowej na poziomie 2 oraz w lokalizacji cytoplazmatycznej na poziomie 1 (HER4, x200)

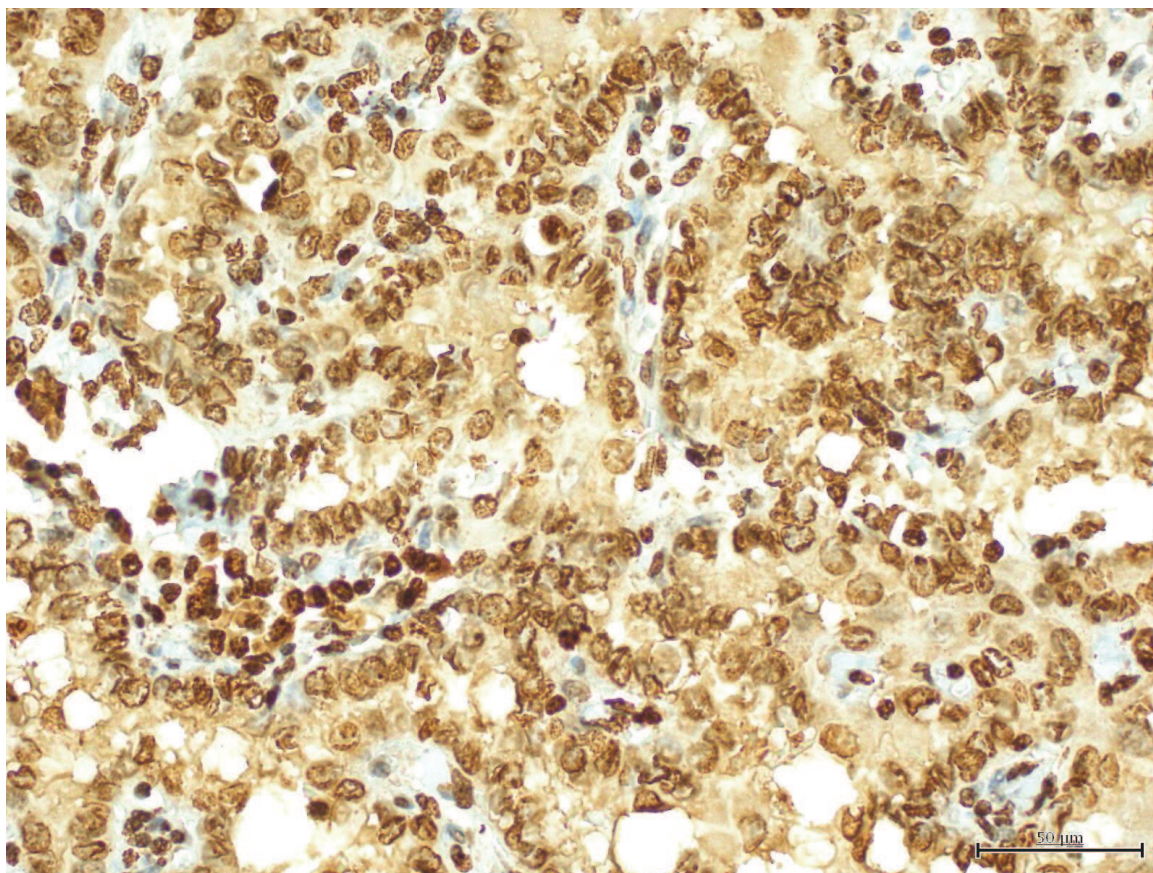


Tabela 5. Ekspresja antygenu ErbB4 w ocenie immunohistochemicznej.

Lokalizacja		Intensywność odczynu				Odsetek k-k z (+) odczynem		
		0	1	2	3	<80%	80-90%	>90%
jądrowa	n	-	16	28	-	-	8	36
	%	-	36,4	63,6	-	-	18,2	81,8
cytoplazmatyczna	n	0	45	-	-	-	-	45
	%	0	100	-	-	-	-	100

7.1.2. Zależności pomiędzy liczbą komórek a intensywnością odczynu IHC

W zakresie wszystkich analizowanych antygenów, z wyjątkiem ErbB4, nasilenie odczynu IHC korelowało z liczbą komórek z pozytywnym odczynem w sposób znamieny statystycznie. Szczegółowe wyniki przedstawia Tabela 6. Korelacje te były umiarkowanie silne dla ErbB1 oraz ErbB3 (współczynniki korelacji mieściły się w zakresie 0,35-0,45) oraz bardzo silne dla ErbB2 (współczynniki korelacji w zakresie 0,7-1,0). Brak istotnej korelacji dla ErbB4 jest najpewniej wynikiem zbyt małych różnic w ekspresji tego antygeny pomiędzy próbkami.

Tabela 6. Korelacje pomiędzy ilością komórek z pozytywnym odczynem IHC a nasileniem tego odczynu.

Antygen	Lokalizacja	Wsp. korelacji	P
ErbB1	Bł.	0,46	0,002
ErbB1	Cyt.	0,34	0,020
ErbB2	Bł.	0,71	<0,001
ErbB2	Cyt.	0,98	<0,001
ErbB3	Jądr.	0,40	0,007
ErbB4	Jądr.	0,26	0,093

7.1.3. Ocena ekspresji badanych antygenów przy użyciu wartości *score*

Wartość *score* odzwierciedla ekspresję antygeny zarówno w zakresie intensywności, jak i liczby komórek z pozytywnym odczynem. Ocenę wyrażonej w ten sposób ekspresji poszczególnych antygenów w przebadanych próbkach przedstawia Tabela 7.

W tkance PTC najwyższe mediany *score* obserwowano dla antygenów ErbB4 w lokalizacji jądrowej oraz ErbB1 w lokalizacji błonowej. Umiarkowane wartości *score* dotyczyły odczynu ErbB1 cytoplazmatycznego oraz ErbB4 cytoplazmatycznego. Wartości *score* dla ErbB2 oraz ErbB3 przyjmowały niskie wartości. Ilustrację tych wyników przedstawia Rycina 15.

Tabela 7. Ekspresja antygenów ErbB wyrażona w punktacji *score* (0-300) w PTC i tkance zdrowej.

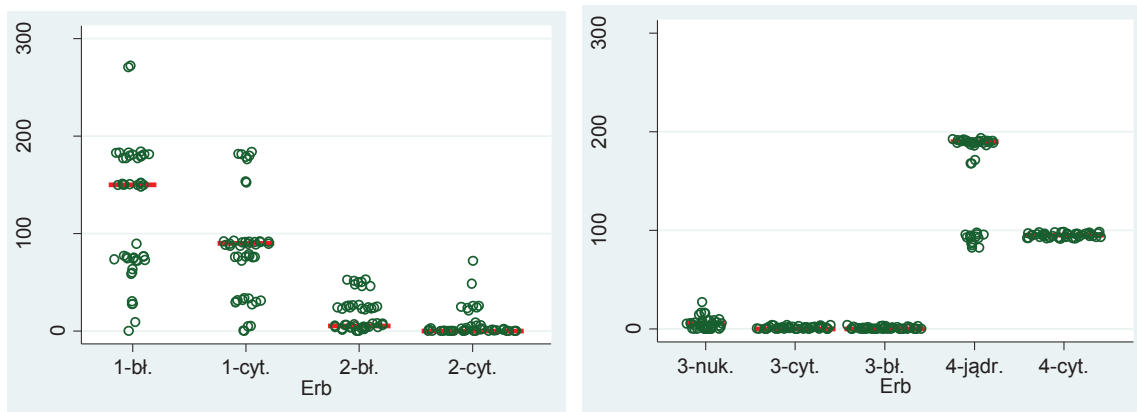
IQR – rozstęp międzykwartyłowy.

Antygen	Lokalizacja	Rak tarczycy		Tkanka zdrowa		p
		Mediana	IQR	Mediana	IQR	
ErbB1	Bł.	150	105	90	0	<0,001

ErbB1	Cyt.	90	60	90	0	0,011
ErbB2	Bł.	5	20	0	0	<0,001
ErbB2	Cyt.	0	5	0	0	0,004
ErbB3	Jądr.	5,5	5	0	0	<0,001
ErbB3	Bł.	0	0	0	0	*
ErbB3	Cyt.	0	0	0	0	*
ErbB4	Jądr.	190	95	95	0	<0,001
ErbB4	Cyt.	95	0	95	0	*

* - brak zmienności; porównanie met. statystycznymi niemożliwe

Rycina 15. Ekspresja antygenów ErbB wyrażona w punktacji *score* (0-300). Poziome linie oznaczają mediany.



W badaniu oceniono także różnice ekspresji badanych antygenów pomiędzy tkanką PTC a zdrową tkanką tarczycy. Zestawienie pomiarów oraz wyniki statystycznych porównań przedstawia Tabela 7.

W tkankach PTC stwierdzono znacznie wyższą ekspresję odczynu błonowego ErbB1 (mediana *score* 150 vs 90 w tkance zdrowej; $p < 0,001$) oraz ErbB4 w lokalizacji jądrowej (mediana 190 vs 95 w tkance zdrowej; $p < 0,001$).

W zakresie ErbB1 cytoplazmatycznego mediany *score* były takie same (=90) w tkankach PTC i tkankach zdrowych, jednak w tkankach raka ekspresja była heterogenna (rozstęp międzykwartyłowy = 60), podczas gdy w tkankach zdrowych idealnie homogenna (rozstęp międzykwartyłowy = 0). Ta różnica była znamienna statystycznie przy $p = 0,011$.

W tkankach PTC wartości *score* dla ErbB2 w lokalizacji błonowej oraz cytoplazmatycznej, ErbB3 w lokalizacji jądrowej były niskie. Jednak, wobec faktu, że w tkankach zdrowych nie obserwowano żadnej ekspresji tych antygenów, różnica okazała się być istotna statystycznie (vide Tabela 7). Nie stwierdzono natomiast różnic w ekspresji ErbB3 w lokalizacji błonowej oraz cytoplazmatycznej, a także ErbB4 w lokalizacji cytoplazmatycznej.

Oceniono także wzajemne korelacje wartości *score* dla poszczególnych antygenów. Wyniki przedstawia Tabela 8. Stwierdzono istnienie umiarkowanych korelacji pomiędzy wartościami *score* dla antygeny ErbB1 w lokalizacji cytoplazmatycznej i błonowej ($r=0,51$; $p<0,001$). Analogiczną korelację o porównywalnej sile stwierdzono dla ErbB2 pomiędzy lokalizacją cytoplazmatyczną i błonową ($r=0,51$; $p<0,001$). Stwierdzono ponadto znamienne korelację pomiędzy wartościami *score* dla błonowych lokalizacji ErbB1 oraz ErbB2 ($r=0,36$; $p=0,015$). Pozostałe korelacje okazały się nie być istotne statystycznie.

Tabela 8. Wzajemne korelacje pomiędzy wartościami *score*.

	ErbB1 bł.	ErbB1 cyt.	ErbB2 bł.	ErbB2 cyt.	ErbB3 jądr.	ErbB3 bł.	ErbB4 jądr.
ErbB1 bł.	1,00						
ErbB1 cyt.	0,51*	1,00					
ErbB2 bł.	0,36**	0,26	1,00				
ErbB2 cyt.	0,05	-0,10	0,51**	1,00			
ErbB3 jądr.	-0,03	-0,20	0,01	0,10	1,00		
ErbB3 bł.	0,03	-0,07	-0,09	0,25	0,24	1,00	
ErbB4 jądr.	0,19	0,06	0,15	0,18	-0,08	0,13	1,00

W tabeli podano współczynniki korelacji. Symbol „*” oznacza istotność statystyczną: * $p<0,001$; ** $0,001 \leq p < 0,01$

Zbadano także korelacje pomiędzy *score* a intensywnością odczynu oraz liczbą komórek z pozytywnym odczynem IHC. Wyniki przedstawia Tabela 9. Stwierdzono, że dla poszczególnych antygenów wartości *score* silnie i znamienne statystycznie korelują zarówno z intensywnością odczynu, jak i liczbą komórek wykazujących dodatni odczyn w ocenie IHC.

Tabela 9. Korelacje pomiędzy wartościami *score* a intensywnością odczynu oraz liczbą komórek wykazujących dodatni odczyn w ocenie IHC.

	ErbB1 <i>score</i>	ErbB2 <i>score</i>	ErbB3 <i>score</i>	ErbB4 <i>score</i>
ErbB1 bł.	0,72 0,87			
ErbB1 cyt.	0,72 0,87			
ErbB2 bł.		0,88 0,96		
ErbB2 cyt.		0,99 0,99		
ErbB3 jądr.			0,63 0,96	
ErbB3 bł.			1,0 1,0	
ErbB4 jądr.				0,93 0,58
W tabeli podano pary współczynników korelacji – pierwsza wartość to korelacja pomiędzy <i>score</i> a intensywnością odczynu, druga wartość to korelacja pomiędzy <i>score</i> a % komórek wykazujących dodatni odczyn IHC. Dla wszystkich korelacji wartości $p < 0,001$				

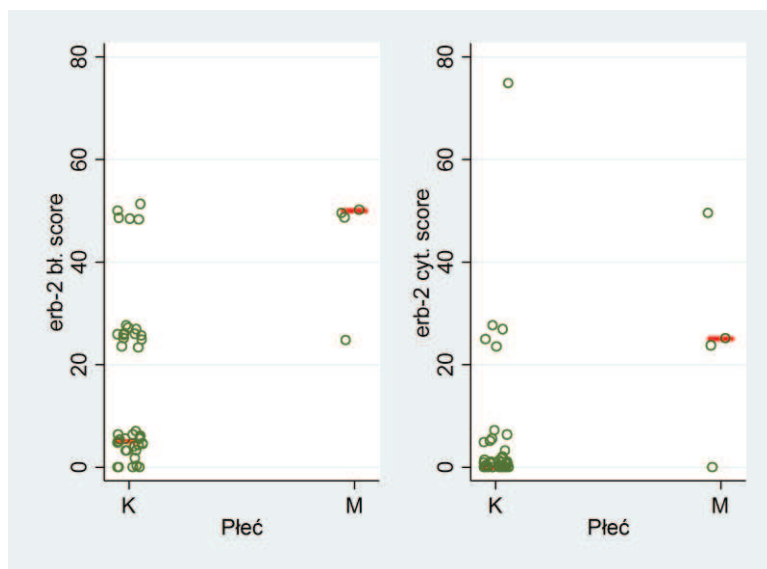
Uzyskane wyniki przemawiają za tym, że wartości *score* reprezentują jednocześnie intensywność odczynu oraz liczbę komórek, w których odczyn był pozytywny. Dlatego właśnie tą zmienną wybrano do przeprowadzenia analizy związków pomiędzy ekspresją ErbB-ów w badanych tkankach a danymi kliniczno-patologicznymi.

7.2. Zależności między ekspresją (wskaźnik *score*) badanych antygenów a danymi kliniczno-patologicznymi

7.2.1. Płeć i wiek

W badanym materiale stwierdzono istnienie znamiennej statystycznie zależności pomiędzy płcią a ekspresją antygenów ErbB2, zarówno w lokalizacji błonowej jak i cytoplazmatycznej. U kobiet mediana *score* wyniosła 5 (95% CI: 5-25) dla lokalizacji błonowej oraz 0 (95% CI: 0-0) dla lokalizacji cytoplazmatycznej. Wśród mężczyzn mediany te wyniosły odpowiednio 50 (95% CI: 25-50) oraz 25 (95%CI: 0-50). Wyniki te ilustruje na Rycinie 16. Współczynniki istotności statystycznej dla różnic pomiędzy płciami (test nieparametryczny) wyniosły odpowiednio $p=0,006$ oraz $p=0,015$. Należy jednak zaznaczyć, że liczebność w grupie mężczyzn była bardzo niewielka i zaobserwowana znamienność statystyczna może być wynikiem błędu statystycznego I rodzaju.

Rycina 16. Ekspresja antygenów ErbB2 w zależności od płci pacjentów. Poziome linie oznaczają medianę



Nie stwierdzono znamiennej statystycznie zależności pomiędzy płcią a ekspresją pozostałych badanych antygenów. Nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów (wskaźnik *score*) a wiekiem. Zestawienie korelacji przedstawia Tabela 10.

Tabela 10. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a wiekiem i płcią pacjentów.

W tabeli podano współczynniki korelacji. Symbol „*” oznacza istotność statystyczną $0,001 \leq p < 0,01$.

Antygen	Lokalizacja	Wiek	Płeć
ErbB1	Bł.	0,04	0,16
ErbB1	Cyt.	-0,02	0,04
ErbB2	Bł.	-0,01	0,40*
ErbB2	Cyt.	-0,07	0,36*
ErbB3	Jądr.	-0,03	0,07
ErbB3	Bł.	0,21	-0,05
ErbB4	Jądr.	0,211	0,02

7.2.2. Zaawansowanie kliniczne nowotworu

7.2.2.1. Wielkość guza

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a wielkością guza. Zestawienie korelacji przedstawia Tabela 11.

Tabela 11. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a wielkością pierwotnego ogniska nowotworowego. W tabeli pokazano współczynniki korelacji. Współczynniki istotności statystycznej wynosiły $p > 0,1$ dla wszystkich przedstawionych korelacji.

Antygen	Lokalizacja	Wielkość [cm]
ErbB1	Bł.	-0,02
ErbB1	Cyt.	-0,01
ErbB2	Bł.	-0,09
ErbB2	Cyt.	-0,03
ErbB3	Jądr.	-0,09
ErbB3	Bł.	-0,19
ErbB4	Jądr.	0,19

7.2.2.2. Zajęcie węzłów chłonnych

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a zajęciem węzłów chłonnych. Zestawienie korelacji przedstawia Tabela 12.

Tabela 12. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a zajęciem węzłów chłonnych. W tabeli pokazano współczynniki korelacji. Współczynniki istotności statystycznej wynosiły $p > 0.1$ dla wszystkich przedstawionych korelacji.

Antygen	Lokalizacja	pN+
ErbB1	Bł.	-0,27
ErbB1	Cyt.	0,04
ErbB2	Bł.	0,03
ErbB2	Cyt.	-0,02
ErbB3	Jądr.	0,02
ErbB3	Bł.	-0,09
ErbB4	Jądr.	-0,04

7.2.3. Cechy histopatologiczne nowotworu

7.2.3.1. Wielogniskowość

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a wielogniskowym występowaniem nowotworu. Zestawienie korelacji przedstawia Tabela 13.

Tabela 13. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a wielogniskowym występowaniem nowotworu. W tabeli pokazano współczynniki korelacji. Współczynniki istotności statystycznej wynosiły $p > 0.1$ dla wszystkich przedstawionych korelacji.

Antygen	Lokalizacja	Wielogniskowość
ErbB1	Bł.	-0,01
ErbB1	Cyt.	-0,15
ErbB2	Bł.	0,12
ErbB2	Cyt.	0,04
ErbB3	Jądr.	0,15
ErbB3	Bł.	-0,11
ErbB4	Jądr.	-0,24

7.2.3.2. Występowanie obustronne (prawy i lewy płąt tarczycy)

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a obustronnym występowaniem nowotworu. Zestawienie korelacji przedstawia Tabela 14.

Tabela 14. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a występowaniem nowotworu w obu płatach tarczycy jednocześnie. W tabeli pokazano współczynniki korelacji. Współczynniki istotności statystycznej wynosiły $p > 0.1$ dla wszystkich przedstawionych korelacji.

Antygen	Lokalizacja	Obustronność
ErbB1	Bł.	-0,03
ErbB1	Cyt.	0,06
ErbB2	Bł.	0,20
ErbB2	Cyt.	0,12
ErbB3	Jądr.	0,07
ErbB3	Bł.	-0,08
ErbB4	Jądr.	0,08

7.2.3.3. Naciekanie naczyń

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a naciekaniami naczyń krwionośnych. Zestawienie korelacji przedstawia Tabela 15.

Tabela 15. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a naciekaniami naczyń przez nowotwór. W tabeli przedstawiono współczynniki korelacji. Współczynniki istotności statystycznej wynosiły $p > 0.1$ dla wszystkich badanych korelacji.

Antygen	Lokalizacja	Inwazja naczyń
ErbB1	Bł.	-0,08
ErbB1	Cyt.	-0,25
ErbB2	Bł.	-0,06
ErbB2	Cyt.	0,06
ErbB3	Jądr.	-0,05
ErbB3	Bł.	-0,06
ErbB4	Jądr.	0,13

7.2.3.4. Naciekanie torebki guza

Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a naciekaniami torebki guza. Zestawienie korelacji przedstawia Tabela 16.

Tabela 16. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a naciekaniami torebki guza przez nowotwór. W tabeli pokazano współczynniki korelacji. Współczynniki istotności statystycznej wynosiły $p > 0.1$ dla wszystkich przedstawionych korelacji.

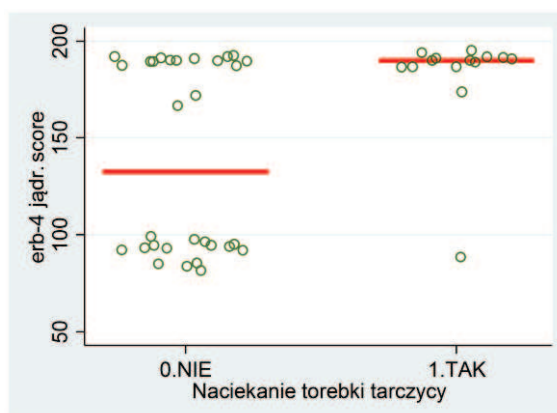
Antygen	Lokalizacja	Naciekanie torebki guza
ErbB1	Bł.	-0,10
ErbB1	Cyt.	-0,11
ErbB2	Bł.	0,02
ErbB2	Cyt.	0,01
ErbB3	Jądr.	0,11
ErbB3	Bł.	0,13
ErbB4	Jądr.	0,06

7.2.3.5. Naciekanie torebki tarczycy

Stwierdzono wyższą ekspresję ErbB4 w lokalizacji jądrowej w nowotworach naciekających torebkę tarczycy w porównaniu do nowotworów nie naciekających tej torebki (Rycina 17). Mediany *score* wyniosły odpowiednio 190 oraz 132. Ta różnica była istotna statystycznie przy $p=0,010$.

Różnice w ekspresji pozostałych antygenów nie były znamienne statystycznie. Zestawienie korelacji przedstawia Tabela 17.

Rycina 17. Ekspresja ErbB4 w lokalizacji jądrowej w guzach naciekających i nienaciekających torebkę tarczycy.



*Poziome linie oznaczają medianę.

Tabela 17. Zależności pomiędzy ekspresją badanych antygenów a naciekaniem torebki tarczycy. W tabeli pokazano współczynniki korelacji. Współczynniki istotności statystycznej wynosiły $p=0,010$ dla * oraz $p>0.1$ dla wszystkich pozostałych korelacji.

Antygen	Lokalizacja	Naciekanie torebki tarczycy
ErbB1	Bł.	0,13
ErbB1	Cyt.	0,05
ErbB2	Bł.	0,04
ErbB2	Cyt.	0,04
ErbB3	Jądr.	0,19
ErbB3	Bł.	0,22
ErbB4	Jądr.	0,39*

7.3. Analiza wieloczynnikowa

Związek pomiędzy ekspresją IHC poszczególnych antygenów a danymi kliniczno-patologicznymi oceniono przy użyciu modelu regresji liniowej wieloczynnikowej. Zmienną niezależną była ekspresja kolejnych antygenów wyrażona wartością *score*. Zmienne zależne do modelu dobierano metodą krokową wsteczną a początkowy zestaw zmiennych zawierał: wiek

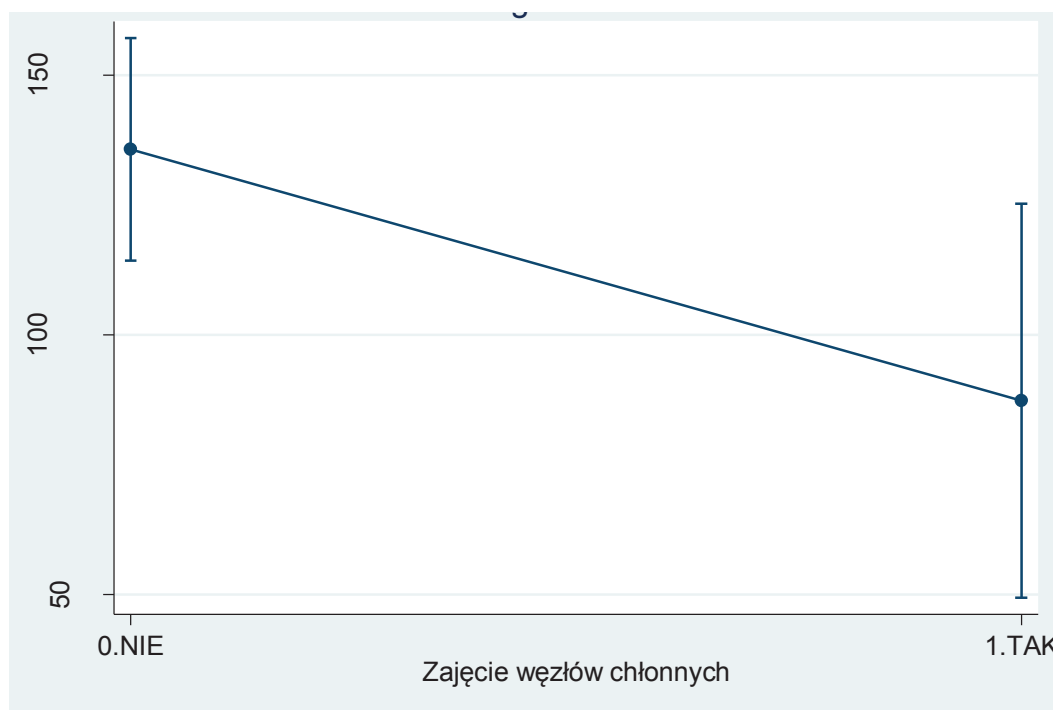
pacjenta, wielkość guza, zajęcie węzłów chłonnych, wieloogniskowość, naciekanie naczyń, naciekanie torebki guza, naciekanie torebki tarczycy.

7.3.1. ErbB1

7.3.1.1. Lokalizacja błonowa

Do ostatecznego modelu zakwalifikowały się zmienne: naciekanie torebki guza ($p=0.161$), naciekanie torebki tarczycy ($p=0,077$) oraz obecność przerzutów w węzłach chłonnych ($p=0.031$). W tym modelu obecność przerzutów w węzłach wiązało się z niższą o 48,3 (95%CI 4,6-92,2) średnią wartością *score*. Model wyjaśniał 16% zmienności zmiennej zależnej. Ilustrację stwierdzonej zależności pokazuje Rycina 18.

Rycina 18. Analiza wieloczynnikowa - związek pomiędzy ekspresją ErbB1 (odczyn błonowy) a występowaniem przerzutów w węzłach chłonnych.



Na osi odciętych wartości score dla ErbB1 przewidywane przez model wieloczynnikowy. Wykres przedstawia średnie oraz ich 95% przedziały ufności.

7.3.1.2. Lokalizacja cytoplazmatyczna

W ostatecznym modelu pozostała jedna zmienna – naciekanie naczyń, jednak jej istotność statystyczna ($p=0,085$) nie przekroczyła zakładanego w badaniu progu.

7.3.2. ErbB2

7.3.2.1. Lokalizacja błonowa

Wszystkie zmienne zależne zostały usunięte z modelu ostatecznego.

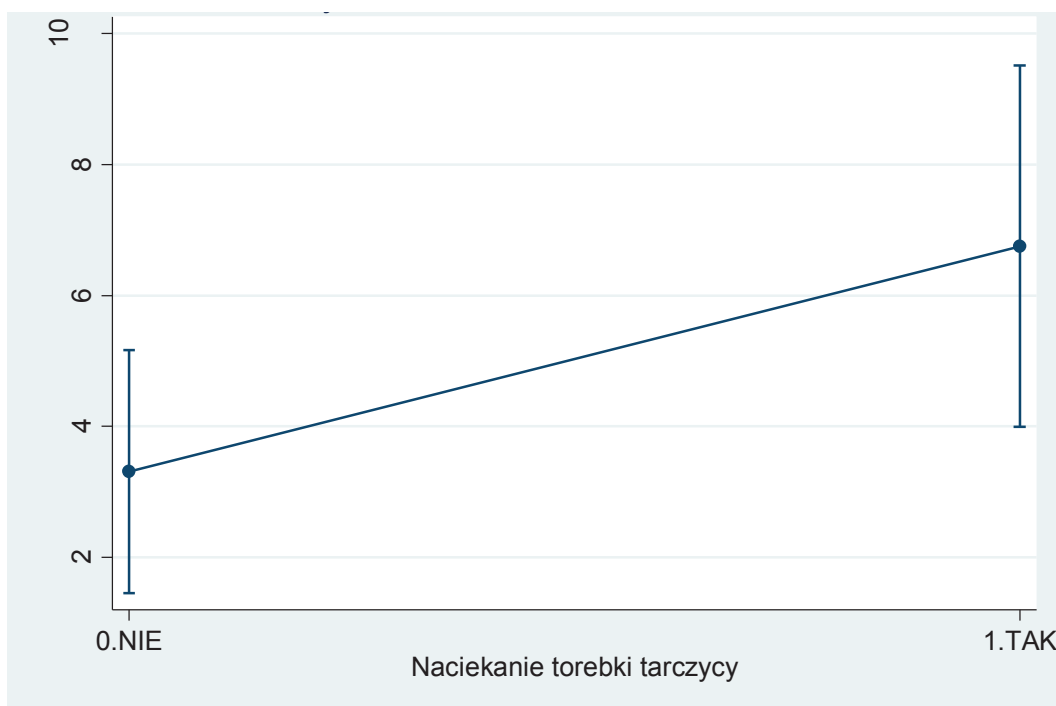
7.3.2.2. Lokalizacja cytoplazmatyczna

Wszystkie zmienne zależne zostały usunięte z modelu ostatecznego.

7.3.3. ErbB3

W ostatecznym modelu pozostała jedna zmienna – naciekanie torebki tarczycy. Występowanie tej cechy wiązało się z wyższą o 3.4 (95%CI 0.1-6.8) średnią wartością *score*. Model wyjaśniał 9,2% zmienności zmiennej zależnej. Ilustrację stwierdzonej zależności przedstawia Rycina 19.

Rycina 19. Analiza wieloczynnikowa - związek pomiędzy ekspresją ErbB3 (odczyn jądrowy) a naciekaniami torebki tarczycy.



Na osi odciętych wartości *score* dla ErbB3 przewidywane przez model wieloczynnikowy. Wykres przedstawia średnie oraz ich 95% przedziały ufności.

7.3.3.1. Lokalizacja cytoplazmatyczna

Brak zmienności zmiennej zależnej. Analiza nie była możliwa.

7.3.3.2. Lokalizacja błonowa

W ostatecznym modelu pozostała jedna zmienna – naciekanie torebki tarczycy, jednak jej istotność statystyczna ($p=0,138$) nie przekroczyła zakładanego w badaniu progu. \

7.3.4. ErbB4

7.3.4.1. Lokalizacja jądrowa

Do ostatecznego modelu zakwalifikowały się zmienne: naciekanie torebki tarczycy ($p=0.007$), oraz wielogniskowość ($p=0.119$). W tym modelu naciekanie torebki tarczycy wiązało się z wyższą o 39,5 (95%CI 11.6-67.4) średnią wartością score. Model wyjaśniał 21% zmienności zmiennej zależnej.

7.3.4.2. Lokalizacja cytoplazmatyczna

Brak zmienności zmiennej zależnej. Analiza nie była możliwa.

7.4. Podsumowanie wyników

1. W przebadanych próbkach pochodzących z pierwotnych ognisk PTC stwierdzono:
 - umiarkowanie silną ekspresję antygeny ErbB1 w lokalizacji błonowej oraz ErbB4 w lokalizacji jądrowej
 - umiarkowaną ekspresję antygeny ErbB1 w lokalizacji cytoplazmatycznej oraz ErbB4 w lokalizacji cytoplazmatycznej
 - niską ekspresję antygenów ErbB2 błonowego oraz ErbB3 jądrowego.

Nie stwierdzono lub wykryto jedynie śladową ekspresję antygeny ErbB2 cytoplazmatycznego, ErbB3 błonowego oraz ErbB3 cytoplazmatycznego

2. Stwierdzono znaczne różnice pomiędzy ekspresją błonowego ErbB1 oraz jądrowego ErbB4 pomiędzy tkankami raka tarczycy a tkankami zdrowymi.
3. W przebadanych próbkach wykazano znamienne statystycznie istnienie korelacji pomiędzy ekspresją ErbB1 w lokalizacji błonowej a ErbB1 w lokalizacji cytoplazmatycznej, ekspresją ErbB1 w lokalizacji błonowej a ErbB2 w lokalizacji błonowej, a także znamienne korelację pomiędzy ekspresją ErbB2 w lokalizacji błonowej a ErbB2 w lokalizacji cytoplazmatycznej.
4. Nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją poszczególnych antygenów a większością parametrów klinicznych i patomorfologicznych. Jedyne zaobserwowane istotne statystycznie zależności to:

-
- wyższa ekspresja ErbB2 w lokalizacji błonowej oraz cytoplazmatycznej w guzach pochodzących od mężczyzn niż od kobiet (jednak liczba próbek od mężczyzn wynosiła tylko 4)
 - obecność przerzutów w węzłach chłonnych wiązała się z niższą ekspresją ErbB1 w lokalizacji błonowej
 - naciekanie torebki tarczycy wiązało się z wyższą ekspresją ErbB3 w lokalizacji jądrowej oraz wyższą ekspresją ErbB4 w lokalizacji jądrowej

Stwierdzono przydatność kliniczną wskaźnika *score* jako miary ekspresji antygenów. Dla badanych antygenów wskaźnik ten silnie korelował zarówno z intensywnością odczynu jak i odsetkiem komórek wykazujących dodatni odczyn IHC.

8. DYSKUSJA

Rak brodawkowy tarczycy (PTC) jest w wielu krajach najczęstszą postacią histopatologiczną raka gruczołu tarczowego [69], który w wielu przypadkach pozostaje niemy klinicznie, aż do jego przypadkowego wykrycia w badaniu autopsyjnym lub rutynowym badaniu histo-patologicznym, po usunięciu chirurgicznym. Częstość występowania PTC w badaniach autopsyjnych wynosi od 3% do 36% [70]. W krajach skandynawskich współczynnik zapadalności, wg danych WHO z 2012, wynosi od 3,6 do 6,3 [5][71] i chociaż w porównaniu do innych nowotworów, jest stosunkowo niski to częstość występowania tzw. ukrytego raka brodawkowego (OPC) jest o wiele większa i waha się pomiędzy 5,6% a 28,4% [72][73][74]. Rozwój nowoczesnych technik ultrasonograficznych oraz biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej (BACC, ang. FNAB) [75] przyczynił się w znacznym stopniu do zwiększenia wykrywalności PTC niemego klinicznie (w tym mikroraka brodawkowego tarczycy – PMC). Pośród wszystkich wykrywanych klasycznych PTC ponad 30% przypadków stanowią PMC [76], czyli raki o klasycznej histopatologicznej strukturze PTC, które nie przekraczają największego wymiaru 10mm. Bardzo dobre rokowanie u pacjentów u których wykryto PMC nie zmienia faktu, że współczynnik śmiertelności związany z PMC wynosi ok. 1% [77], a prawdopodobieństwo nawrotu w regionalnych węzłach chłonnych ok. 5% [77]. Według Yasuhiro i wsp. możliwość pojawienia się nowych przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych w okresie 5 lat wynosi 1,4%, a 3,4% po 10 latach [75], natomiast prawdopodobieństwo przerzutów odległych ok. 2,5% [77]. Wielkość guza jest istotnym czynnikiem prognostycznym w przypadku PTC. W dobrze zróżnicowanych PTC (z wyjątkiem PMC) za czynniki prognostyczne, które zwiększają prawdopodobieństwo nawrotu choroby uważa się: wiek powyżej 45, płeć męską, niski stopień zróżnicowania histologicznego, średnicę guza powyżej 3-4cm, zajęcie naczyń limfatycznych (łac. lymphangitis carcinomatosa), pozataarczycowe szerzenie się, obecność przerzutów w trakcie rozpoznania oraz obecność przerzutów odległych [78][79]. W analizach wieloczynnikowych w PTC za istotne czynniki prognostyczne dla kobiet przyjmuje się: wiek, wielkość guza oraz obecność zajęcia naczyń limfatycznych, a dla mężczyzn obecność przerzutów w trakcie rozpoznania oraz torbielowaty charakter wzrostu [78].

Rozwój nowoczesnych technik biologii molekularnej w ostatnich dwóch dziesięcioleciach pozwolił na wyodrębnienie innych czynników prognostycznych w zróżnicowanych rakach tarczycy (DTC) do których zalicza się PTC. Pośród ważniejszych należy wymienić: mutację genu *BRAF* (zwanego proto-onkogenem *B-Raf*) kodującego białko B-Raf o aktywności kinazy

serynowo-treoninowej, uczestniczącego w kaskadzie przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych. Mutacja genu *BRAF* jest najczęstszą zmianą genetyczną w TC i występuje w około 45% postaci sporadycznej PTC [17][80], szczególnie w podtypach uważanych za bardziej agresywne, takich jak wysoko-komórkowy PTC. Mutacja *BRAF* występuje wyłącznie w PTC i wywodzących się z PTC rakach niskozróżnicowanych tarczycy, w tym ATC [81]. Mimo częstej obecności rearanżacji genu *RET* (zwanej mutacją *RET/PTC*) [82], szczególnie w PTC u młodych osób i u pacjentów po radioterapii, nie stwierdzono jej istotnej korelacji z innymi czynnikami kliniczno-patologicznymi [17]. Podobnie, obecna w <10% PTC rearanżacja *NTRK1* (receptor błonowy neurotropowej kinazy tyrozynowej) również nie ma znaczenia prognostycznego [83]. Do niedawna uważano, że rearanżacje genów są charakterystyczne głównie dla nowotworów hematologicznych. Spośród guzów litych zaobserwowano je głównie w mięsakiach i TC. Nie jest do końca jasne dlaczego komórki pęcherzykowe tarczycy wykazują wyraźną zwiększoną predyspozycję do mutacji genowych [84], szczególnie w TC u ludzi młodych [85] i nie jest do końca zrozumiałe, że jest to związane w większości przypadków z dobrym rokowaniem.

Celem niniejszej pracy jest ocena IHC obecności receptorów HER w PTC, ich korelacja z wybranymi parametrami morfologicznymi i klinicznymi oraz ewentualne zależności między nimi. Nieprawidłowa, nadmierna aktywacja receptorów HER w nowotworach może wynikać z amplifikacji lub mutacji punktowej genu, a także nadekspresji lub rodzaju ekspresji jego produktu białkowego. Lepsze zrozumienie funkcji receptorów HER może przyczynić się do identyfikacji nowych biomarkerów PTC. Dodatkowo receptory HER mogą stanowić nowy cel terapeutyczny dla selektywnych inhibitorów lub pan-ErbB inhibitorów, w uzupełnieniu do chemio- i radioterapii w guzach o niekorzystnym rokowaniu.

W badanej grupie 45 PTC stwierdziłem za pomocą IHC ekspresję wszystkich receptorów grupy HER. Receptor EGFR/HER1 w lokalizacji błonowej ujawnił się w 44 przypadkach (97,8%), przy czym w 29 przypadkach jego intensywność była wyrażona na poziomie odczynu 2 i 3 (64,4%). W większości badanych skrawków PTC (37) odsetek komórek nowotworowych wykazujących dodatni odczyn błonowy HER1 był powyżej 50%. Wyliczona wartość *score* wahała się pomiędzy 0 a 270, a mediana wskaźnika *score* dla odczynu błonowego HER1 wyniosła 150 (jedna z najwyższych). W grupie kontrolnej (45 skrawków nienowotworowych) w lokalizacji błonowej intensywność odczynu EGFR była wyrażona na poziomie 1 w 34 próbkach (75,6%), a antygen nie ujawnił się w 11 przypadkach. Odczynu EGFR na poziomie 2 i 3 w tkance zdrowej nie obserwowano. Wyżej wymieniona różnica jest statystycznie znamienne ($p < 0,001$). Stwierdziłem umiarkowaną zależność pomiędzy nasileniem odczynu błonowego a % komórek go wykazujących

($p=0,002$, $r=0,46$). Stwierdziłem również obecność odczynu ErbB1 w lokalizacji cytoplazmatycznej. I tak cytoplazmatyczną ekspresję HER1 znalazłem w 43 próbkach (95,6%), w 35 intensywność odczynu była na poziomie 1 (77,8%), a jedynie w 8 przypadkach (17,8%) na poziomie 2. Mediana wartości *score* wyniosła 90. Obserwowałem ponadto mniejszą niż w odczynie błonowym zależność pomiędzy intensywnością reakcji cytoplazmatycznej HER1 a procentem komórek ją wykazujących ($p=0,020$, $r=0,34$). W grupie kontrolnej odczyn cytoplazmatyczny EGFR wypadł na poziomie 1 w 44 skrawkach tkanki zdrowej, a nie ujawnił się w jednym przypadku. Współczynnik p wynosi 0,011, a więc ww różnice w odczynach cytoplazmatycznych pomiędzy PTC a tkanką zdrową są także znamienne statystycznie. Dodatkowo znalazłem istotną statystycznie, umiarkowanie silną zależność pomiędzy wartościami *score* odczynu cytoplazmatycznego i błonowego ErbB1 ($r=0,51$, $p<0,001$). Z powyższych danych wynika, wyraźny, znamienne statystycznie wzrost ekspresji EGFR w lokalizacji błonowej w tkance PTC w stosunku do tkanki zdrowej, mniejsza zależność choć również znamienne statystycznie dotyczy odczynu cytoplazmatycznego. W opracowaniu Wisemana i wsp. [86] receptor EGFR/HER1 został wykazany w 76% przypadków zróżnicowanych raków tarczycy (DTC), a jedynie w 59,6% zmian łagodnych, różnica była znamienne statystycznie ($p=0,013$). Niestety, to badanie dotyczy całej grupy DTC, nie ma w niej odniesienia wyłącznie do grupy PTC, nie ma również wyraźnego rozróżnienia pomiędzy odczynem EGFR/HER1 cytoplazmatycznym a błonowym. Przez to połączenie, obie zmienne zostały uznane za znamienne statystycznie, co może prowadzić do błędnych wniosków. Wg Marti i wsp. [87] cytoplazmatyczny odczyn EGFR jest charakterystyczny dla tkanki zdrowej (obecny jest również, silny wg autora w chorobie Graves-Basedowa), co może potwierdzać tezę nieistotności statystycznej odczynu cytoplazmatycznego EGFR w PTC. Dodatkowo w pracy tej wykazano obecność odczynu jądrowego EGFR w tkance zdrowej, gruczolakach i FTC, w przeciwieństwie do wyraźnego braku tego odczynu w PTC. W moich badaniach nie stwierdziłem w żadnej z tkanek, ani zdrowej ani chorej, jądrowego odczynu IHC dla EGFR (w tym również wyraźny brak jądrowego odczynu IHC dla EGFR w PTC). Wynika to z mojego założenia, że słabe zabarwienie w rzucie jądra komórkowego jest efektem raczej nakładającej się, wykazującej odczyn IHC cytoplazmy a nie rzeczywistego odczynu jądrowego. Nie mogę w związku z tym uznać za istotne, znaczenia odczynu jądrowego EGFR w PTC. W pracy Westermarka i wsp. [88] zasugerowano zmienność dystrybucji błonowego odczynu EGFR, który - wg autorów - miałby dotyczyć całości błony w komórkach nowotworowych, a w tkance zdrowej i zmianach nienowotworowych - części bocznych i podstawnych błon komórkowych. Powyższe dane nie znajdują potwierdzenia w moich badaniach, nie zaobserwowałem istotnych powtarzalnych różnic w dystrybucji błonowego EGFR pomiędzy

tkanką zdrową a PTC. Poza tym wspomniana publikacja obejmuje jedynie dwa przypadki PTC, czyli grupa badana jest mało reprezentatywna. Podsumowując, należy stwierdzić, że w badanej grupie wystąpiły wyraźne statystycznie znamienne ilościowe różnice w ekspresji błonowego EGFR (odczyn błonowy EGFR częściej wypadł na poziomie odczynu 2 i 3 w PTC w porównaniu do niezmienionej tkanki tarczycy), co mogłoby mieć znaczenie diagnostyczne w powiązaniu z innymi cechami histo-patologicznymi i mogłoby stanowić podstawę do dalszych badań nad rolą HER1 w onkogenezie PTC. Mniejszą zmienność, choć również znamienne statystycznie obserwowałem w odczynie cytoplazmatycznym EGFR. Wykazana dodatnia korelacja pomiędzy błonowym a cytoplazmatycznym odczynem EGFR może być - w mojej ocenie – dowodem na to, że cytoplazmatyczny odczyn nie jest artefaktem (np. utrwalenia), ale może być wykładnikiem zwiększonej obecności receptora w cytoplazmie PCT, co również może mieć znaczenie diagnostyczne.

Nieco inaczej przedstawia się immunohistochemiczna ekspresja receptora HER2 w badanej grupie. W większości próbek (39; 86,7%) stwierdziłem dodatni odczyn błonowy HER2, ale jedynie w 8 (17,7%) ekspresję na poziomie odczynu 2, a w pozostałych 31 (68,9%) na poziomie 1. Ponadto stwierdziłem bardzo silną korelację pomiędzy intensywnością odczynu a % komórek go wykazujących ($r=0,71$, $p<0,001$). Wskaźnik *score* odczynu błonowego HER2 przyjmował niskie wartości pomiędzy 0 a 50, przyjmując medianę 5. W grupie kontrolnej nie wykazałem obecności błonowego odczynu HER2, w związku z tym współczynnik istotności statystycznej wyniósł $p < 0,001$. Mimo niskich wartości *score* błonowego HER2, należy przyjąć tę zmienność za istotną statystycznie. Jeszcze słabiej ujawnił się odczyn cytoplazmatyczny HER2 – w 31 przypadkach PTC (68,9%) nie obserwowałem żadnego mierzalnego odczynu, a w pozostałych w większości na poziomie 1 (12; 26,7%), w dwóch próbkach (4,4%) na poziomie odczynu 2 i 3 należy uznać najprawdopodobniej jako rezultat wynik wadliwego utrwalenia materiału pooperacyjnego. Stwierdziłem silną korelację pomiędzy % komórek go wykazujących a intensywnością ($r=0,98$; $p<0,001$). Średnie wartości *score* przyjmowały dla cytoplazmatycznego HER2 niskie wartości (od 0 do 75), z medianą 0. W grupie kontrolnej odczyn cytoplazmatyczny HER2 nie ujawnił się. Mimo tego należy uznać, że występujące różnice odczynu cytoplazmatycznego HER2 są znamienne statystycznie ($p=0,004$). Obserwowałem również podobnie jak w przypadku EGFR umiarkowaną korelację, statystycznie znamienne ($p<0,001$; $r=0,51$) pomiędzy cytoplazmatycznym i błonowym odczynem. Kremser i wsp. [89] wykazali obecność odczynu HER2 zarówno błonowego, jak i cytoplazmatycznego, porównując ten ostatni parametr w dwóch grupach pacjentów (po ok. $n=20$), z i bez przerzutów odległych. W opracowaniu tym użyto mieszaniny

dwóch monoklonalnych p-ciał mysich skierowanych na domenę wewnętrzną (cytozolową) HER2. Wiseman i wsp. [86] wykorzystując poliklonalne przeciwciała królicze, wśród 96 DTC (90 PTC, 6 FTC) wykazali ekspresję HER2 jedynie u 2% DTC, w tym były to wyłącznie odczyny błonowe. Nie zaobserwowali oni także statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy tkanką DTC a zdrową (z powodu niskiego odsetka komórek pozytywnych). W mojej pracy wysoki odsetek komórek PTC wykazujących dodatni odczyn błonowy HER2, niski % komórek wykazujących odczyn cytoplazmatyczny HER2, przy jednoczesnym braku ekspresji w próbie kontrolnej, może być związany z wysoką specyficnością klonu użytego p-ciała pierwotnego – klon 4B5, który wg niektórych opracowań wykazuje mniejszy odsetek niespecyficznego odczynu cytoplazmatycznego [90]. Powyższe m.in. dowodzi trudności w ocenie porównawczej wyników badań opisanych w dostępnym piśmiennictwie, w przypadku stosowania nieco odmiennych narzędzi diagnostycznych, na przykład użycie klonów p-ciał skierowanych w stosunku do różnych epitopów tego samego receptora. Jednocześnie należy przypuszczać, że odmienność wyników ekspresji HER2 (a może i innych receptorów grupy ErbB) w PTC nie musi świadczyć o błędnie wykonanych odczynach IHC. Podobne wyniki ekspresji receptora HER2 w PTC (błonowej i cytoplazmatycznej) uzyskali Haugen i wsp. [91] z wykorzystaniem przeciwciała poliklonalnego. W opracowaniu Mondiego i wsp. [92] wykazano obecność receptora HER2 jedynie w lokalizacji błonowej w stopniu umiarkowanym (w 2 przypadkach na 11 PTC). Konkludując należy stwierdzić, że w PTC obecna jest słaba immunohistochemiczna ekspresja receptora HER2, zarówno w lokalizacji błonowej jak i cytoplazmatycznej, przy czym za mocniej istotną statystycznie należy uznać, wg moich badań, ekspresję błonową, co znajduje potwierdzenie w części dostępnych publikacji. Wykazana umiarkowana dodatnia korelacja odczynów błonowych i cytoplazmatycznych w HER2 (mimo ich mniejszego *score* niż w EGFR - patrz Tabela 7) również nie pozwala deprecjonować odczynu HER2 w lokalizacji cytoplazmatycznej i może przemawiać za dystrybucją receptora w cytoplazmie komórki. Brak odczynu w tkance zdrowej tarczycy może sugerować wykorzystanie głównie błonowego odczynu HER2 jako markera diagnostycznego w PTC lub DTC.

Odmienne przedstawia się ekspresja receptora HER3 - w badanej grupie stwierdziłem dość słabą ekspresję jądrową tego receptora, nie znajdując odczynu w lokalizacji cytoplazmatycznej (z wyjątkiem jednego przypadku, być może z powodu błędu wynikającego ze złego utrwalenia materiału) oraz w żadnej z próbek w lokalizacji błonowej. Ekspresja jądrowa HER3 uwidoczniła się w 39 próbkach PTC (86,7%), w większości nie przekraczała 10% komórek. Nie uwidoczniła się natomiast w tkance zdrowej ($p < 0,001$), więc zmienną należy uznać za istotną statystycznie. Wiseman i wsp. [86] opisuje obecność odczynu HER3 cytoplazmatycznie i błonowo w 57% DTC

(spośród wszystkich 96) w porównaniu do tkanki nienowotworowej (tylko 34,3% przypadków wykazywało ekspresję HER3). Stosował on poliklonalne przeciwciała królicze i wykazał istotną znamienne zależność ($p=0,003$). Inną zależność opisał Haugen i wsp. [93], który, w przeciwieństwie do Wisemana, stosując monoklonalne p-ciało mysie nie wykazał obecności ErbB3 w kontrolnej grupie tkanek nienowotworowych, natomiast wykazał odczyn HER3 w 53 na 56 PTC – w 8 PTC wyłącznie odczyn cytoplazmatyczny, w 45 wyłącznie odczyn cytoplazmatyczno-błonowy. Również nie opisał on ekspresji jądrowej HER3. Koumakpayi i wsp. [94] wykazali, stosując monoklonalne p-ciało mysie (takie jak w mojej pracy), istotną statystycznie obecność odczynu jądrowego HER3 w rakach prostaty w stosunku do zmian łagodnych ($p<0,001$), szczególnie wysoki odsetek dotyczył raków prostaty hormono-wrażliwych. Ponadto, w opracowaniu tym wykazano istotną statystycznie ekspresję cytoplazmatyczną HER3 oraz związek ekspresji jądrowej i cytoplazmatycznej HER3 z wyższym stopniem Gleasona. Autorzy ci wysunęli hipotezę, że jądrowy odczyn HER3 może różnić tkankę nienowotworową od nowotworowej. Do podobnych wniosków można by dojść w mojej pracy, ekspresja HER3 (choć słaba i w niewielkiej części komórek) obecna była wyłącznie w PTC, nie była obecna w tkance niezmięnionej, co sugeruje potencjalną możliwość użycia diagnostycznego HER3 w przypadkach PTC. Moje badania obejmują jedynie DTC, interesująca byłaby wiedza na temat obecności HER3 w rakach gorzej zróżnicowanych (np. ATC). Wiseman i wsp. w opracowaniu dotyczącym ATC [95] wykazali w 10 na 94 ATC obecność odczynu HER3 błonowego i cytoplazmatycznego, stosując poliklonalne przeciwciała królicze. Nasuwa się wyraźnie wniosek, że odczyn jądrowy wypadł dodatnio tylko w tych badaniach, w których użyto p-ciała monoklonalnego mysiego. Konkludując, można kolejny raz wysnuć tezę, że bardzo trudna jest analiza porównawcza odczynów IHC wykonywana na bazie różnych p-ciał pierwotnych. Aby potwierdzić wyżej wymienioną zależność odczynu jądrowego HER3 należałoby wykonać badania na większych liczbach przypadków DTC, a także w innych, gorzej zróżnicowanych rakach tarczycy stosując jeden rodzaj monoklonalnego przeciwciała pierwotnego.

Receptor HER4 w moich badaniach wykazał słabą i umiarkowaną ekspresję jądrową na poziomie odczynu 1 i 2 (odpowiednio w 16 i 28 przypadkach) oraz słaby odczyn cytoplazmatyczny (na poziomie 1) we wszystkich przypadkach. Istotny statystycznie okazał się jedynie odczyn jądrowy ($p<0,001$), przy medianie *score* 190. Odczyn cytoplazmatyczny nie różnił się w PTC w porównaniu do tkanek zdrowych, więc nie był brany w analizie porównawczej. W swojej pracy Haugen i wsp. [93] wykazał za pomocą poliklonalnego p-ciała króliczego ekspresję HER4 w niemal wszystkich badanych przypadkach PTC (w 55 na 56) a w 39 wykazał reakcję

silniejszą (cytoplazmatyczną i błonową) w stosunku do tkanek nienowotworowych (nie wykazywały one ekspresji błonowej). Srinivasan i wsp. [96] wykazała (wykorzystując zarówno mysie p-ciało monoklonalne jak i poliklonalne królicze) obecność jądrowego odczynu HER4 w 49% badanych rakach piersi (w stosunku do < 5% w przylegającym zwykłym nabłonku gruczołowym). Ponadto, również stwierdziła obecność odczynu cytoplazmatycznego HER4 o różnym nasileniu w komórkach raka piersi oraz cytoplazmie komórek nienowotworowych, przy czym odczyn ten był wyraźnie mniej istotny statystycznie. Ciekawym opracowaniem dotyczącym rozbieżności lokalizacyjnej ekspresji HER4 jest praca Tovey i wsp. [97], która udowadnia istotne różnice w lokalizacji ekspresji HER4 w zależności od rodzaju użytego p-ciała pierwotnego. Opisuje ona również ekspresję HER4 w lokalizacji jądrowej w rakach piersi, która - wg tego autora - ma wyraźny związek z gorszym rokowaniem. Na tej podstawie można by wysnuć wniosek, że jądrowy odczyn HER4, który wykazałem w mojej pracy jako istotny statystycznie ($p < 0,001$), może sugerować znaczenie receptora HER4 w onkogenezie PTC.

Porównując odczyny ErbB między sobą należy również podkreślić fakt, że w grupie badanych PTC wykazałem wyraźną, statystycznie znamioną ($p < 0,001$), korelację pomiędzy ekspresją błonowego odczynu EGFR a błonowym HER2 (Tab. 8). Nie wykazałem korelacji pomiędzy innymi receptorami (niezależnie od ich lokalizacji). U Wisemana i wsp. [86] wykazano statystycznie znamienne korelacje w DTC pomiędzy HER1 a HER3 w porównaniu do tkanki zdrowej ($p = 0,002$) oraz pomiędzy HER1, HER3 oraz HER4 ($p = 0,033$) w porównaniu do tkanki zdrowej. Haugen i wsp. [93] zaobserwował – nie opisując jednak dokładnie wyników – koekspresję wszystkich czterech receptorów w 36 (64%) przypadkach PTC spośród z 56 badanych. W opracowaniu Wisemana i wsp. [98] dotyczącego raka piersi wykazano, wykorzystując metodę analizy wieloczynnikowej, koekspresję trzech ERbB (HER1, HER2 i HER3), wykazano statystycznie istotny związek tej koekspresji z grupą chorych o gorszym rokowaniu. Wykazana przeze mnie dodatnia korelacja ($r = 0,36$) pomiędzy błonową ekspresją ErbB1(HER1) i ErbB2(HER2) może być wykładnikiem kooperacji tych receptorów w PTC (tworzenie heterodimeru) i może być inspiracją do dalszych badań. W mojej pracy nie wykazałem najbardziej oczywistego - wydaje się - związku HER2 i HER3, które tworzą wspólny heterodimer. Przyczyna tego może leżeć w słabej błonowej ekspresji HER2 w grupie badanych PTC, braku wśród nich błonowej ekspresji HER3, co może mieć związek ze znikomą rolą – wg niektórych badaczy - tych receptorów w molekularnej biologii DTC [99] oraz z rodzajem zastosowanych p-ciał pierwotnych. Nie znalazłem publikacji, które nie tylko by pokazywały przybliżone wyniki, ale również stosowały takie same metody badawcze.

Omawiając związek ekspresji receptorów grupy HER w PTC z poszczególnymi parametrami morfologicznymi i klinicznymi, nie sposób pominąć faktu, że badana grupa PTC obejmuje wyłącznie klasyczne jego postaci, co jest wyraźnym ograniczeniem tego badania. Obecność w niej na przykład grupy ATC, a więc raków również wywodzących się z nabłonka pęcherzykowego, dałoby możliwość szerszej analizy porównawczej. W opracowaniu Ito i wsp. [100] dotyczącym 5768 PTC (608 mężczyzn – 10,5% i 5160 kobiet – 89,5%) wykazano silny związek czynników prognostycznych PTC, takich jak pozatarczycowe szerzenie się, obecność przerzutów w węzłach chłonnych (N>3cm) z płcią i wiekiem. Na dość dużej grupie badanej (podobnej odsetkowo do mojej 4 M – 8,9%, 41 K – 91%) wykazano, że pozatarczycowe szerzenie się PTC jest najbardziej istotnym czynnikiem prognostycznym dla starszych osób (niezależnie od płci) oraz dla młodych mężczyzn. Z kolei Lee i wsp. [101] wykazał w grupie 168 pacjentów z PTC wyraźny związek EGFR (HER1) – razem z p53 - z płcią męską oraz z obecnością przerzutów w węzłach chłonnych. Nie wykazano natomiast statystycznego związku ekspresji EGFR z wiekiem i pozatarczycowym szerzeniem się. Schiff i wsp. [102] wykazali, w badaniu wykorzystującym techniki mikromacierzy tkankowych, wyraźną nadekspresję EGFR w ATC oraz hamowanie proliferacji komórkowej gefitinibem ludzkich hodowli linii komórkowych ATC. Powyższe badania mogą sugerować znaczącą rolę EGFR w procesie onkogenezy PTC i ATC oraz ustawiają jego ekspresję wśród istotnych czynników prognostycznych oraz być może predykcyjnych [102] w TC wywodzących się z nabłonka pęcherzykowego. W mojej pracy nie wykazałem znamiennego związku EGFR (odczynu błonowego i cytoplazmatycznego), zarówno w analizach jednoczynnikowych, jak i w analizie wieloczynnikowej z wybranymi parametrami histopatologicznymi i klinicznymi. Nie wykazałem statystycznie znamiennego, opisanego w publikacjach, związku ekspresji EGFR z płcią (Tab. 10) ani z zajęciem węzłów chłonnych (Tab. 12), choć należy zaznaczyć że liczba przypadków z cechą pN1 wynosiła 11 (24,4% badanej grupy). Co więcej w analizie wieloczynnikowej ekspresja błonowego EGFR wykazała odwrotną zależność z zajęciem węzłów chłonnych (Rycina 18), choć model statystyczny wyjaśniał jedynie 16% zmiennej zależnej. Dlatego należy wysnuć tezę że na ekspresję błonowego EGFR w 84% mają wpływ inne czynniki w tej pracy nie uwzględnione. Brak istotnej zależności statystycznej może być też skutkiem zbyt małej liczebności grupy badanej – 45, w porównaniu do badań Ito i wsp. [100] obejmujących 5768 przypadków PTC oraz braku niskozróżnicowanych, jak wspomniano wyżej, raków ATC.

W raku gruczołu piersiowego ludzki receptor epidermalnego czynnika wzrostu 2 (HER2) jest dobrze rozpoznany czynnikiem prognostycznym i predykcyjnym, natomiast jego rola w

przypadkach DTC w dalszym ciągu pozostaje niejasna [103]. Analiza jednoczynnikowa w moich badaniach immunohistochemicznej ekspresji ErbB2 wykazała zwiększoną ekspresję tego receptora (cytoplazmatyczną i błonową) u pacjentów płci męskiej (Rycina 16), odpowiednio współczynniki korelacji wynosiły $r=0,36$ i $r=0,40$ (Tab. 10). Jednak grupa badana liczyła tylko 4 (8,9%) mężczyzn i była w związku z tym mało reprezentatywna. Obserwacji tej nie potwierdziła analiza wieloczynnikowa. Nie wykazałem również związku innych cech kliniczno-patologicznych z ekspresją ErbB2. W opracowaniu Mda*h* i wsp. [103] podobnie nie wykazano statystycznie znamiennego związku pomiędzy ekspresją HER2 a parametrami kliniczno-patologicznymi, analizując 69 przypadki DTC, w tym 58 PTC. Stwierdzono metodami IHC i hybrydyzacji „*in situ*” ekspresję HER2 na 1+/2+ u 4 pacjentów PTC i nie stwierdzono związku z takimi cechami kliniczno-patologicznymi jak: wielkość guza, stopień zróżnicowania histopatologicznego, obecność przerzutów w węzłach chłonnych szyi. Próbę oceny obecności amplifikacji ErbB2 w nowotworach tarczycy metodą hybrydyzacji „*in situ*” podjęli już w 1988 Aasland i wsp. [104] wykazując obecność 2-3-krotnej zwiększonej ekspresji (także koekspresji) onkogenu *c-erbB2* i *c-erbB2/neu* w trzech z pięciu badanych PTC oraz w trzech przerzutach w węzłach chłonnych (w opracowaniu nie podano histologicznego typu wtórnych ognisk w badanych węzłach chłonnych). Jednak nie była to taka ekspresja jaką wykazano jednocześnie w raku piersi - ponad 20-krotna amplifikacja genu *c-erbB2/neu* (nie onkogenu *c-ErbB2*, który zaobserwowano w tkance nienowotworowej – łożysku). Ponadto niskie poziomy *c-ErbB2* i *c-ErbB2/neu* wykazano w ATC. Istotną wartość poznawczą wydaje się mieć, w tych badaniach, fakt umiarkowanej amplifikacji onkogenu *c-ErbB2/neu* w PTC. Haugen i wsp. [91] wykazali w 1992 metodą IHC, wykorzystując mrożone skrawki tkankowe, wyraźną ekspresję c-ErbB2 (błonową i cytoplazmatyczną) w 12 na 17 PTC, nie wykazując natomiast ekspresji w 5 przypadkach FTC, w 5 gruczolakach pęcherzykowych i w 1 przypadku MTC. Wyniki te potwierdzono metodą hybrydyzacji (slot-blot), stwierdzając wyraźnie podwyższony poziom Her2/neu mRNA w tych próbkach. Powyższe obserwacje zasugerowały jednak innym badaczom prawdopodobny możliwy związek amplifikacji ErbB2 w PTC z jego biologicznym zachowaniem i innymi danymi klinicznymi. Utrilla i wsp. [105], wykorzystując poliklonalne p-ciało skierowane na domenę cytozolową ErbB2, w grupie 25 PTC stwierdził w 13 (52%) wyraźną rozlaną ekspresję cytoplazmatyczną HER2 (oprócz słabej błonowej) oraz cytoplazmatyczną reakcję we wszystkich badanych 18 przypadkach MTC. Nie stwierdził tej ekspresji w gruczolakach i FTC oraz w przypadkach ATC. Na tej podstawie wnioskował, że podwyższony poziom białka ErbB2 jest typową cechą PTC. Tej ostatniej tezy nie potwierdziły badania Kremsera i wsp. [89] którzy nie tylko stwierdzili obecność cytoplazmatycznej reakcji HER-2 w FTC, ale również zaobserwowali wyraźną zmienną

korelację pomiędzy cytoplazmatyczną ekspresją HER-2/neu w PTC i w FTC a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych (ale tylko odległych – nie wykazano związku zwiększenia ekspresji ErbB2 z przerzutami w węzłach chłonnych szyi) oraz z wiekiem, nie wykazując związku z płcią. Ponadto Kremser i wsp. [89] nie wykazali związku pomiędzy ekspresją HER-2 a miejscem wtórego ogniska DTC. Lemoine i wsp. jeszcze w 1990 [106] na dużej grupie badanych (w łagodnych i złośliwych guzach tarczycy) stosując metodę hybrydyzacji Southerna, PCR oraz IHC nie wykazał zmian w strukturze i ekspresji proto-onkogenu *c-ErbB2* i stąd wnioskował, że aktywacja tego onkogenu niekoniecznie musi być obecna w transformacji nowotworowej guzów tarczycy i mieć znaczenie prognostyczne. U badanych 127 pacjentów z PTC tarczycy Akslen i wsp. [107] wykazali ekspresję ErbB2 błonową w 52% i cytoplazmatyczną w 88% i stwierdzili jedynie zależność statystyczną wśród kobiet: spadek ekspresji białka c-ErbB2 związanego z obniżeniem czasu przeżycia chorych. W mojej pracy, w trakcie gromadzenia danych klinicznych, wszyscy pacjenci żyli, więc nie uwzględniano tego parametru klinicznego. W analizie wieloczynnikowej Akslen i wsp. (1995) [107] wykazali ponadto niezależny związek płci męskiej, starszego wieku i niskiego stopnia zróżnicowania histologicznego z czasem przeżycia. Nie wykazali związku ekspresji ErbB2 z tymi parametrami. We wcześniejszym opracowaniu (1993) Akslen i wsp. [108] sugerowali związek cytoplazmatycznej ekspresji ErbB2 z obecnością inwazji pozatarczycowej oraz wznowy miejscowej oraz związek ekspresji błonowej ErbB2 z brakiem przerzutów w węzłach chłonnych. Sugg i wsp. [109] wykorzystując monoklonalne p-ciało skierowane do zewnętrznej domeny HER2 w DTC w grupie 34 PTC nie wykazał mutacji ani amplifikacji genu *c-ErbB2*. Metodą PCR stwierdził statystycznie znamienne podniesiony poziom mRNA w 11 PTC w stosunku do zwykłej tkanki tarczycowej, nie obserwował jednak jego związku z czynnikami prognostycznymi. Ponadto stwierdzono immunohistochemicznie, wykorzystując monoklonalne p-ciało skierowane do zewnętrznej domeny HER2, wzmożony odczyn cytoplazmatyczny HER2, który wg tych autorów korelował z wysokim zróżnicowaniem tych nowotworów i mógłby być wskaźnikiem dobrego rokowania. Należy jeszcze wspomnieć, dla pełnego obrazu złożoności oceny immunohistochemicznej ekspresji ErbB2, o badaniach Pottera i wsp. [110] który odkrył homolog białkowy o nazwie p155, zlokalizowany w grzebieniach mitochondriów, odpowiedzialny za wzmożony odczyn cytoplazmatyczny HER2 w rakach urotelialnych pęcherza moczowego. Może to świadczyć o niestabilności samej onkoproteiny, powodując silny, w części ziarnisty odczyn cytoplazmatyczny HER2 w tych nowotworach [110]. Na koniec należy wspomnieć o koncepcji Soares i wsp. [111] który opisał nieuglikozylowaną formę białka ErbB2 w cytoplazmie w PTC, która miałaby nie przemieszczać się w kierunku błony komórkowej i być odpowiedzialną za wzmożony odczyn cytoplazmatyczny. Należy podkreślić

fakt stosowania różnych metod diagnostycznych (PCR, hybrydyzacja, IHC) w celu oceny nadekspresji HER2. Żadna z nich w mojej ocenie, nie dostarczyła przekonujących dowodów na obecność znaczącej amplifikacji HER2 w PTC. Ponadto, jedną z głównych przyczyn różnorodności wyników IHC w ocenie ekspresji białka c-ErbB2 w PTC, jest - oprócz zbyt małej liczebności badanych (również w mojej pracy) - duża różnorodność p-ciał pierwotnych stosowanych do oceny poziomu ErbB2. Stosowane przeciwciała były często poliklonalne oraz skierowane do różnych części strukturalnych receptora (domen), którego złożoność budowy wykazano we wstępie mojej pracy. Nie brano także pod uwagę niestabilności białka ErbB2, które mogą teoretycznie doprowadzić do jego braku ekspresji błonowej, a tym samym braku realizacji podstawowej funkcji receptora, jakim jest pośrednictwo w przekazywaniu sygnałów komórkowych. Ponadto, na podstawie mojego badania, nie można ocenić korelacji pomiędzy ekspresją receptora HER2 a stopniem zróżnicowania histo-patologicznego, ponieważ grupa badanych raków zawierała wyłącznie dobrze zróżnicowane nowotwory. Podsumowując, biorąc pod uwagę szereg przytoczonych wyżej badań oraz brak w mojej pracy istotnej statystycznie zależności pomiędzy ekspresją IHC białka ErbB2 w PTC a czynnikami kliniczno-patologicznymi, należy przyjąć, że HER-2 nie może być uznany w PTC za istotny czynnik prognostyczny i predykcyjny, a opisane w piśmiennictwie zależności, nie znalazły potwierdzenia w mojej pracy.

Najmniej poznana grupa receptorów nabłonkowych czynników wzrostu w PTC są HER3 i HER4, o czym może świadczyć zdecydowanie mniejsza liczba publikacji dostępnych w literaturze. Haugen i wsp. [93] w grupie 56 przypadków PTC, metodami IHC na mrożonych skrawkach tkankowych, wykazał wzrost ekspresji białek ErbB3 i ErbB4 w stosunku do nienowotworowej tkanki tarczycowej. Nie stwierdził on jednocześnie amplifikacji odpowiadających im genów. W mojej pracy metodą analizy wieloczynnikowej stwierdziłem wyraźny, znamieny statystycznie związek ekspresji jądrowej ErbB3 i ErbB4 z naciekaniami torebki gruczołu tarczowego (a więc potencjalnym szerzeniem się pozatarczycowym nowotworu). Liczba przypadków wykazujących cechę pT4 wynosiła 12 (26,7%). W pracy Wisemana i wsp. [86] błonowo-cytoplazmatyczna ekspresja HER3 (57% DTC), ujawniona poliklonalnym p-ciałem króliczym, wykazywała dodatni związek z obecnością przerzutów PTC w węzłach chłonnych, natomiast ekspresja białka HER4 (73% DTC) - również wykazana poliklonalnym p-ciałem króliczym - korelowała ujemnie ze stopniem zaawansowania T. Ponadto wg niektórych autorów istnieje związek pomiędzy mutacją *BRAF* a ekspresją HER3 [17][112]. Podsumowując, należy stwierdzić na podstawie uzyskanych wyników oraz dostępnego piśmiennictwa, że ekspresja HER3 i HER4 w PTC może być związana z parametrami morfologicznymi i klinicznymi sugerującymi

zwiększoną agresywność PTC. Słabo dodatnia korelacji, wykazana w moim badaniu, pomiędzy jądrową ekspresją HER4 a wielkością PTC, nie miała znamion znamienności statystycznej ($p > 0,1$).

Podsumowując, należy stwierdzić, że wykonane przeze mnie badania ekspresji rodziny receptorów ErbB/HER w PTC, dowiodły obecności tych białek w dobrze zróżnicowanych rakach gruczołu tarczowego, co potwierdza zasadność podjętych badań. Nie wykazałem, w analizach wieloczynnikowych, istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją ErbB/HER a większością parametrów klinicznych i patomorfologicznych. Wykazana odwrotna, statystycznie znamienna, korelacja błonowej ekspresji EGFR/HER1 z zajęciem węzłów chłonnych oraz dodatnia korelacja jądrowej ekspresji HER3 i HER4 z naciekaniem torebki gruczołu sugeruje konieczność wykonania dalszych badań na większej liczbie grupie guzów oraz poszerzenie jej o przypadki o niższym stopniu zróżnicowania histo-patologicznego.

9. WNIOSKI

1. Stwierdzono ekspresję wszystkich czterech receptorów nabłonkowych czynników wzrostu (ErbB/HER) w rakach brodawkowatych gruczołu tarczowego.
2. W badanej grupie stwierdzono zależność pomiędzy następującymi receptorami a wybranymi parametrami klinicznymi i morfologicznymi: ekspresją błonową ErbB1 a obecnością przerzutów w węzłach chłonnych oraz jądrową ekspresją ErbB3 i ErbB4 a naciekaniem torebki narządowej.
3. Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy: błonową i cytoplazmatyczną ekspresją ErbB1, błonową i cytoplazmatyczną ekspresją ErbB2 oraz błonową ekspresją ErbB1 i błonową ekspresją ErbB2.

10. STRESZCZENIE

Rak brodawkowy tarczycy (PTC) jest nowotworem stosunkowo rzadkim, częściej występującym u kobiet, z zaobserwowanymi wyraźnymi różnicami w zapadalności w poszczególnych krajach. Uważa się obecnie, że zwiększone spożycie jodu nie jest związane z istotnym zwiększeniem zachorowalności na ten nowotwór. Udowodniono wyraźny związek pomiędzy wzrostem zachorowalności na nowotwory tarczycy a zwiększoną ekspozycją na promieniowanie radioaktywne. Ponadto w ostatnich latach, dzięki rozwojowi technik biologii molekularnej, wykazano wyraźnie zwiększoną predyspozycję komórek raka tarczycy do mutacji genowych (podobnie jak w nowotworach hematologicznych i mięsakiach). Odkryto kilka istotnych w procesie onkogenezy PTC punktowych mutacji genowych (*BRAF*, *RAS*) oraz rearanżacji chromosomowych (*RET*, *NTRK1*). Aktywacja tych protoonkogenów może prowadzić między innymi do zaburzeń w systemie szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, zmian strukturalnych białek o aktywności kinazowej i w rezultacie do przemiany nowotworowej. Rodzina receptorów ErbB/HER, związana z systemem transdukcji sygnałowej wewnątrzkomórkowej, jest jednym z elementów większej grupy receptorów nabłonkowych czynników wzrostu o aktywności kinaz tyrozynowych.

Celem pracy była ocena immunohistochemicznej ekspresji receptorów nabłonkowych czynników wzrostu (ErbB/HER) w PTC, ich wzajemne korelacje oraz ewentualne powiązanie z wybranymi cechami patomorfologicznymi i klinicznymi.

Do badań zakwalifikowano 45 guzów z rozpoznaniem PTC, pochodzących od chorych w wieku 17 do 82 lat (41 kobiet i 3 mężczyzn), zarchiwizowanych w blokach parafinowych w Zakładzie Patomorfologii Szpitala Św. Wojciecha w Gdańsku Zaspie Copernicus Sp. z o.o. Grupę kontrolną (45) stanowiły fragmenty mięszu tarczycy, pochodzące z niezmienionego drugiego płata gruczołu tarczowego lub innego fragmentu mięszu tarczycy, o prawidłowej strukturze makro- i mikroskopowej. Wszystkie odczyny immunohistochemiczne wykonano metodą automatyczną, wykorzystując monoklonalne przeciwciała skierowane przeciw domenom wewnętrznym receptorów HER, zgodnie z zaleceniami producentów.

W wykonanych badaniach stwierdzono ekspresję wszystkich 4 receptorów grupy ErbB/HER w rakach brodawkowych tarczycy, najsilniejszą w lokalizacji błonowej ErbB1/EGFR oraz lokalizacji jądrowej ErbB4/HER4. Stwierdzono znamiennej statystycznie korelację pomiędzy błonową i cytoplazmatyczną ekspresją ErbB1/HER1, błonową i cytoplazmatyczną reakcją ErbB2/HER2 oraz błonową ekspresją ErbB1/HER1 i błonową reakcją ErbB2/HER2. Ponadto

stwierdzono ujemną korelację pomiędzy obecnością przerzutów w węzłach chłonnych a ekspresją ErbB1 w lokalizacji błonowej oraz dodatnią korelację ErbB3/HER3 i ErbB4/HER4 w guzach naciekających torebkę tarczycy. Nie stwierdzono statystycznej zależności pomiędzy ekspresją receptorów ErbB/HER a pozostałymi parametrami klinicznymi i patomorfologicznymi.

11. SUMMARY

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is a relatively rare cancer, more common in women with observed distinct differences in the incidence in different countries. It is now believed that increased intake of iodine is not associated with a significant increase in the incidence of this cancer. It has been shown a clear link between the increase in the incidence of thyroid cancer and increased exposure to radiation. Moreover, in recent years through the development of molecular biological techniques clearly demonstrated increased predisposition risk of thyroid cancer cells to genetic mutations (as in haematological malignancies and sarcomas). Discovered several significant in the process of oncogenesis PTC gene point mutations (BRAF, RAS) and chromosomal rearrangements (RET NTRK1). Activation of proto-oncogenes can lead among other things to disturbances in the system of intracellular signaling pathways, structural change of the protein kinase activity and, consequently, to neoplastic transformation. ErbB receptor family / HER associated with intracellular signal transduction system, is one element of a larger group of epithelial growth factor receptor tyrosine kinases.

The aim of the study was to evaluate the immunohistochemical expression of epithelial growth factor receptor (ErbB / HER) in PTC, their correlations and possible link with selected features of pathomorphological and clinical.

The study enrolled 45 diagnosed with PTC tumors derived from patients aged 17 to 82 years (41 women and 3 men), archived in paraffin blocks in the Department of Pathology of the Hospital of St. Adalbert in Gdansk Zaspas Copernicus Sp. o.o. The control group (45) were fragments of flesh thyroid unchanged from the second panel of the thyroid gland or other fragment of the thyroid parenchyma, with proper macro and microscopic structure. All immunohistochemical staining was performed using an automated method using monoclonal antibodies directed against domains of the internal HER receptor in accordance with the manufacturer's recommendations.

Laboratory tests found the expression of all four receptors of the ErbB / HER in papillary thyroid carcinomas, the strongest in the location membrane ErbB1 / EGFR and nuclear localization ErbB4 / HER4. There was a significant correlation between the membrane and cytoplasmic expression of ErbB1 / HER1, the cytoplasmic and membrane reaction ErbB2 / HER2 and membrane expression of ErbB1 / HER1 and membrane reaction ErbB2 / HER2. In addition, a negative correlation was found between the presence of metastases in the lymph nodes and the expression of ErbB1 the location of the membrane and a positive correlation ErbB3 / HER3 and ErbB4 / HER4 in tumors infiltrating the thyroid capsule. There was no statistical relationship

between the expression of the receptors of the ErbB / HER and other parameters of clinical and pathomorphological changes.

12. PIŚMIENICTWO

- [1] “Nowotwory tarczycy (C73) | KRN,” *Krajowy Rejestr Nowotworów*, 2015. [Online]. Available: <http://onkologia.org.pl/nowotwory-tarczycy-c73/>.
- [2] K. Sworczak, “Anomalie liczby kopii genów protoonkogenów rodziny erbB w rakach gruczołu tarczowego iw guzach chromochłonnych u ludzi. Rozprawa habilitacyjna,” *Ann. Acad Med Gedan*, vol. 33, pp. 1–165, 2003.
- [3] A. Zonenberg, W. Zarzycki, and M. Leoniak, “Wpływ awarii w Czarnobylu na występowanie nowotworów tarczycy - Stan po 20 latach,” *Endokrynol. Pol.*, vol. 57, no. 3, pp. 244–252, 2006.
- [4] S. Nagataki and E. Nyström, “Epidemiology and primary prevention of thyroid cancer,” *Thyroid*, vol. 12, no. 10, pp. 889–96, Oct. 2002.
- [5] “EUCAN Factsheets | Thyroid cancer,” *IARC*, 2012. [Online]. Available: <http://eco.iarc.fr/eucan/Cancer.aspx?Cancer=35>.
- [6] J. Waterhouse, T. Mack, and C. Muir, *International Agency for Research on Cancer*. Lyon, 1987.
- [7] H. Roszkowska and P. Goryński, “Nowotwory tarczycy w Polsce w latach 1980–2000,” *Przegl. Epidemiol.*, vol. 58, pp. 369–376, 2004.
- [8] B. A. Policeni, W. R. K. Smoker, and D. L. Reede, “Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands,” *Semin. Ultrasound. CT. MR*, vol. 33, no. 2, pp. 104–14, Apr. 2012.
- [9] M. A. Basson, “Signaling in Cell Differentiation and Morphogenesis,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 4, no. 6, p. a008151, Jun. 2012.
- [10] G. Morreale de Escobar, M. J. Obregon, and F. Escobar del Rey, “Role of thyroid hormone during early brain development,” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 151 Suppl, pp. U25–U37, 2004.
- [11] J. Zhang and M. A. Lazar, “The mechanism of action of thyroid hormones,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 62, pp. 439–66, 2000.
- [12] B. Skowrońska, M. Fichna, and P. Fichna, “Rola tkanki tłuszczowej w układzie dokrewnym.” [Online]. Available: <file:///C:/Users/MENDELEY/Documents/26089-31836-1-PB.pdf>. [Accessed: 24-Sep-2015].

- [13] L. T. YE Nikiforov, PW Biddinger, *Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid: A Comprehensive Guide for Practicing Thyroid Pathology*, 2nd ed. 2012.
- [14] M. Karczewska-Mastalerz and A. Minczykowski, "Tarczycza i serce," *Kardiol. po Dyplomie*, vol. 11, pp. 42–49, 2012.
- [15] V. Kumar, A. K. Abbas, and Aster. Jon C., "The Endocrine System," *Robbins Cotran Pathol. Basis Dis. 9th Ed.*, pp. 1082–1083, 2015.
- [16] M. Puzianowska-Kuźnicka and M. Pietrzak, "Genetic factors predisposing to the development of papillary thyroid cancer," *Endokrynol. Pol.*, vol. 56, no. 3, pp. 339–345, 2005.
- [17] D. Handkiewicz-Junak, A. Czarniecka, and B. Jarzab, "Molecular prognostic markers in papillary and follicular thyroid cancer: Current status and future directions," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 322, no. 1–2, pp. 8–28, Jun. 2010.
- [18] Z. Zhu, R. Ciampi, M. N. Nikiforova, M. Gandhi, and Y. E. Nikiforov, "Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 91, no. 9, pp. 3603–3610, 2006.
- [19] H. M. Rabes, E. P. Demidchik, J. D. Sidorow, E. Lengfelder, C. Beimfohr, D. Hoelzel, and S. Klugbauer, "Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications," *Clin. Cancer Res.*, vol. 6, no. 3, pp. 1093–1103, 2000.
- [20] J. Di Cristofaro, M. Marcy, V. Vasko, F. Sebag, N. Fakhry, D. Wynford-Thomas, and C. De Micco, "Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant," *Hum. Pathol.*, vol. 37, no. 7, pp. 824–830, 2006.
- [21] Z. Zhu, M. Gandhi, M. N. Nikiforova, A. H. Fischer, and Y. E. Nikiforov, "Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 120, no. 1, pp. 71–77, 2003.
- [22] J. Z. Nowak, J. B. Zawilska, and J. Barańska, *Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, 2004.
- [23] A. Stępień, M. Izdebska, and A. Grzanka, "Rodzaje śmierci komórki The types of cell death," *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2007. [Online]. Available: <http://www.phmd.pl/fulltxhtml.php?ICID=490830>.
- [24] M. Pfreundschuh, D. Alsteens, R. Wieneke, C. Zhang, S. R. Coughlin, R. Tampe, B. K.

-
- Kobilka, and D. J. Müller, “Identifying and quantifying two ligand-binding sites while imaging native human membrane receptors by AFM,” *Nat. Commun.*, vol. 6, 2015.
- [25] L. Rajendran, H.-J. Knölker, and K. Simons, “Subcellular targeting strategies for drug design and delivery,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 9.1, pp. 29–42, 2010.
- [26] B. K. Kobilka and X. Deupi, “Conformational complexity of G-protein-coupled receptors.,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 28, no. 8, pp. 397–406, Aug. 2007.
- [27] O. A.; Fearnle. Karpov Gareth W.; Smith, Gina A.; Kankanala, Jayakanth; McPherson, Michael J.; Tomlinson, Darren C.; Harrison, Michael A.; Ponnambalam, Sreenivasan; “Receptor tyrosine kinase structure and function in health and disease,” *AIMS Biophys.*, vol. 2, no. 4, pp. 476–502.
- [28] E. Kovacs, J. A. Zorn, Y. Huang, T. Barros, and J. Kuriyan, “A structural perspective on the regulation of the epidermal growth factor receptor,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 84, pp. 739–764, 2015.
- [29] M. A. Lemmon and J. Schlessinger, “Cell signaling by receptor tyrosine kinases,” *Cell*, vol. 141, no. 7, pp. 1117–1134, 2010.
- [30] S. Li, K. R. Schmitz, P. D. Jeffrey, J. J. W. Wiltzius, P. Kussie, and K. M. Ferguson, “Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab,” *Cancer Cell*, vol. 7, no. 4, pp. 301–311, 2005.
- [31] S. Gamou and N. Shimizu, “Glycosylation of the epidermal growth factor receptor and its relationship to membrane transport and ligand binding,” *J. Biochem.*, vol. 104, no. 3, pp. 388–396, 1988.
- [32] K. Bielawski, U. Vogt, and B. Falkiewicz, “Budowa i funkcje receptorów ErbB (HER),” *Współczesna Onkol.*, vol. 6, pp. 241–243, 1999.
- [33] J. Downward, Y. Yarden, E. Mayes, G. Scrace, N. Totty, P. Stockwell, A. Ullrich, J. Schlessinger, and M. D. Waterfield, “Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences,” 1984.
- [34] S. Cohen, “Epidermal growth factor,” *Biosci. Rep.*, vol. 6, no. 12, pp. 1017–1028, 1986.
- [35] C. L. Arteaga and J. A. Engelman, “ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics,” *Cancer Cell*, vol. 25, no. 3, pp. 282–303, Mar. 2014.
- [36] D. Harari and Y. Yarden, “Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer.,” *Oncogene*, vol. 19, no. 53, 2000.

- [37] S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, and D. A. Haber, "Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 3, pp. 169–181, 2007.
- [38] M. Westphal, L. Meima, E. Szonyi, J. Lofgren, H. Meissner, W. Hamel, K. Nikolics, and M. X. Sliwkowski, "Heregulins and the ErbB-2/3/4 receptors in gliomas," *J. Neurooncol.*, vol. 35, no. 3, pp. 335–346, 1997.
- [39] M. Lynch and J. S. Conery, "The evolutionary fate and consequences of duplicate genes," *Science (80-.)*, vol. 290, no. 5494, pp. 1151–1155, 2000.
- [40] Y. Yarden and M. X. Sliwkowski, "Untangling the ErbB signalling network," *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 127–137, 2001.
- [41] N. Jura, Y. Shan, X. Cao, D. E. Shaw, and J. Kuriyan, "Structural analysis of the catalytically inactive kinase domain of the human EGF receptor 3," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 51, pp. 21608–21613, 2009.
- [42] M. B. Berger, J. M. Mendrola, and M. A. Lemmon, "ErbB3/HER3 does not homodimerize upon neuregulin binding at the cell surface," *FEBS Lett.*, vol. 569, no. 1, pp. 332–336, 2004.
- [43] Y. Yarden and J. Schlessinger, "Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation," *Biochemistry*, vol. 26, no. 5, pp. 1434–1442, 1987.
- [44] Y. Yarden and J. Schlessinger, "Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor," *Biochemistry*, vol. 26, no. 5, pp. 1443–1451, 1987.
- [45] A. M. Honegger, R. M. Kris, A. Ullrich, and J. Schlessinger, "Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 86, no. 3, pp. 925–929, 1989.
- [46] M. Vecchi, J. Baulida, and G. Carpenter, "Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 31, pp. 18989–18995, 1996.
- [47] D. J. Leahy, "Structure and function of the epidermal growth factor (EGF/ErbB) family of receptors," *Adv Protein Chem*, vol. 68, no. 1, pp. 1–27, 2004.
- [48] T. P. J. Garrett, N. M. McKern, M. Lou, T. C. Elleman, T. E. Adams, G. O. Lovrecz, H.-J. Zhu, F. Walker, M. J. Frenkel, and P. A. Hoyne, "Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor α ," *Cell*, vol. 110, no.

-
- 6, pp. 763–773, 2002.
- [49] B. J. Hackel, J. R. Neil, F. M. White, and K. D. Wittrup, “Epidermal growth factor receptor downregulation by small heterodimeric binding proteins,” *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 25, no. 2, pp. 47–57, 2012.
- [50] E. R. Wood, A. T. Truesdale, O. B. McDonald, D. Yuan, A. Hassell, S. H. Dickerson, B. Ellis, C. Pennisi, E. Horne, and K. Lackey, “A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib) relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 18, pp. 6652–6659, 2004.
- [51] N. Gotoh, A. Tojo, M. Hino, Y. Yazaki, and M. Shibuya, “A highly conserved tyrosine residue at codon 845 within the kinase domain is not required for the transforming activity of human epidermal growth factor receptor,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 186, no. 2, pp. 768–774, 1992.
- [52] X. Zhang, J. Gureasko, K. Shen, P. A. Cole, and J. Kuriyan, “An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor,” *Cell*, vol. 125, no. 6, pp. 1137–1149, 2006.
- [53] T. S. Collier, K. Diraviyam, J. Monsey, W. Shen, D. Sept, and R. Bose, “Carboxyl group footprinting mass spectrometry and molecular dynamics identify key interactions in the HER2-HER3 receptor tyrosine kinase interface,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 35, pp. 25254–25264, 2013.
- [54] C. Qiu, M. K. Tarrant, S. H. Choi, A. Sathyamurthy, R. Bose, S. Banjade, A. Pal, W. G. Bornmann, M. A. Lemmon, and P. A. Cole, “Mechanism of activation and inhibition of the HER4/ErbB4 kinase,” *Structure*, vol. 16, no. 3, pp. 460–467, 2008.
- [55] K. Aertgeerts, R. Skene, J. Yano, B.-C. Sang, H. Zou, G. Snell, A. Jennings, K. Iwamoto, N. Habuka, and A. Hirokawa, “Structural analysis of the mechanism of inhibition and allosteric activation of the kinase domain of HER2 protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 21, pp. 18756–18765, 2011.
- [56] C. L. Arteaga and J. A. Engelman, “ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics,” *Cancer Cell*, vol. 25, no. 3, pp. 282–303, 2014.
- [57] C.-H. Yun, T. J. Boggon, Y. Li, M. S. Woo, H. Greulich, M. Meyerson, and M. J. Eck, “Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity,” *Cancer Cell*, vol. 11, no. 3, pp.

217–227, 2007.

- [58] K. D. Carey, A. J. Garton, M. S. Romero, J. Kahler, S. Thomson, S. Ross, F. Park, J. D. Haley, N. Gibson, and M. X. Sliwkowski, “Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 16, pp. 8163–8171, 2006.
- [59] C.-H. Yun, K. E. Mengwasser, A. V Toms, M. S. Woo, H. Greulich, K.-K. Wong, M. Meyerson, and M. J. Eck, “The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 6, pp. 2070–2075, 2008.
- [60] M. Huse, Y.-G. Chen, J. Massagué, and J. Kuriyan, “Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF β receptor in complex with FKBP12,” *Cell*, vol. 96, no. 3, pp. 425–436, 1999.
- [61] E. R. Wood, L. M. Shewchuk, B. Ellis, P. Brignola, R. L. Brashear, T. R. Caferro, S. H. Dickerson, H. D. Dickson, K. H. Donaldson, and M. Gaul, “6-Ethynylthieno [3, 2-d]-and 6-ethynylthieno [2, 3-d] pyrimidin-4-anilines as tunable covalent modifiers of ErbB kinases,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 8, pp. 2773–2778, 2008.
- [62] M. R. Brewer, S. H. Choi, D. Alvarado, K. Moravcevic, A. Pozzi, M. A. Lemmon, and G. Carpenter, “The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain,” *Mol. Cell*, vol. 34, no. 6, pp. 641–651, 2009.
- [63] S. J. Fleishman, J. Schlessinger, and N. Ben-Tal, “A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 99, no. 25, pp. 15937–15940, 2002.
- [64] N. F. Endres, R. Das, A. W. Smith, A. Arkhipov, E. Kovacs, Y. Huang, J. G. Pelton, Y. Shan, D. E. Shaw, and D. E. Wemmer, “Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor,” *Cell*, vol. 152, no. 3, pp. 543–556, 2013.
- [65] A. Arkhipov, Y. Shan, R. Das, N. F. Endres, M. P. Eastwood, D. E. Wemmer, J. Kuriyan, and D. E. Shaw, “Architecture and membrane interactions of the EGF receptor,” *Cell*, vol. 152, no. 3, pp. 557–569, 2013.
- [66] T. Moriki, H. Maruyama, and I. N. Maruyama, “Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain,” *J. Mol. Biol.*, vol. 311, no. 5, pp. 1011–1026, 2001.
- [67] R. Duchnowska, “Leczenie celowane—nowe nadzieje w leczeniu raka piersi,” *Onkol. w Prakt.*

Klin., vol. 3, no. 3, pp. 128–134, 2007.

- [68] C. of A. Pathologists, 325 Waukegan Road, and I. 60093-2750 Northfield, “Cancer Protocol Templates - College of American Pathologists.” [Online]. Available: http://www.cap.org/web/home/resources/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates?_adf.ctrl-state=pjaq83wll_17&_aftrLoop=685859175141250#%40%3F_aftrLoop%3D685859175141250%26_adf.ctrl-state%3Difg34y82g_4. [Accessed: 22-Oct-2015].
- [69] J. Waterhouse, C. Muir, K. SHANMUGARATNAM, and J. POWELL, *Cancer incidence in five continents. Vol. IV.*, no. 42. 1982.
- [70] A. Nasir, A. Z. Chaudhry, J. Gillespie, and H. E. Kaiser, “Papillary microcarcinoma of the thyroid: a clinico-pathologic and prognostic review.,” *In Vivo*, vol. 14, no. 2, pp. 367–376, 2000.
- [71] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, and F. Bray, “Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012.,” *Eur. J. Cancer*, vol. 49, no. 6, pp. 1374–403, Apr. 2013.
- [72] L. Bondeson and O. Ljungberg, “Occult thyroid carcinoma at autopsy in Malmo, Sweden,” *Cancer*, vol. 47, no. 2, pp. 319–323, 1981.
- [73] R. H. Nishiyama, G. K. Ludwig, and N. W. Thompson, “The prevalence of small papillary thyroid carcinomas in 100 consecutive necropsies in an American population,” *Radiation-Associated Thyroid Carcinoma. New York Grune Strat.*, pp. 123–135, 1977.
- [74] M. A. Sobrinho-Simões, M. C. Sambade, and V. Gonçalves, “Latent thyroid carcinoma at autopsy: a study from Oporto, Portugal,” *Cancer*, vol. 43, no. 5, pp. 1702–1706, 1979.
- [75] Y. Ito, A. Miyauchi, H. Inoue, M. Fukushima, M. Kihara, T. Higashiyama, C. Tomoda, Y. Takamura, K. Kobayashi, and A. Miya, “An observational trial for papillary thyroid microcarcinoma in Japanese patients,” *World J. Surg.*, vol. 34, no. 1, pp. 28–35, 2010.
- [76] M. D. Bramley and B. J. Harrison, “Papillary microcarcinoma of the thyroid gland,” *Br. J. Surg.*, vol. 83, no. 12, pp. 1674–1683, 1996.
- [77] S. Chow, S. C. K. Law, J. K. C. Chan, S. Au, S. Yau, and W. Lau, “Papillary microcarcinoma of the thyroid—prognostic significance of lymph node metastasis and multifocality,” *Cancer*, vol. 98, no. 1, pp. 31–40, 2003.
- [78] A. Schindler, G. van Melle, B. Evequoz, and B. Scazziga, “Prognostic factors in papillary

- carcinoma of the thyroid,” *Cancer*, vol. 68, no. 2, pp. 324–330, 1991.
- [79] J. P. Shah, T. R. Loree, D. Dharker, E. W. Strong, C. Begg, and V. Vlamis, “Prognostic factors in differentiated carcinoma of the thyroid gland,” *Am. J. Surg.*, vol. 164, no. 6, pp. 658–661, Dec. 1992.
- [80] M. Xing, “BRAF mutation in thyroid cancer,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 12, no. 2, pp. 245–262, 2005.
- [81] M. N. Nikiforova, E. T. Kimura, M. Gandhi, P. W. Biddinger, J. A. Knauf, F. Basolo, Z. Zhu, R. Giannini, G. Salvatore, and A. Fusco, “BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 88, no. 11, pp. 5399–5404, 2003.
- [82] Y. E. Nikiforov, “RET/PTC rearrangement in thyroid tumors,” *Endocr. Pathol.*, vol. 13, no. 1, pp. 3–16, 2002.
- [83] E. Brzeziańska, D. Pastuszek-Lewandoska, and A. Lewiński, “Rearrangements of NTRK1 oncogene in papillary thyroid carcinoma,” *Neuro Endocrinol. Lett.*, vol. 28, no. 3, pp. 221–229, 2007.
- [84] M. R. Teixeira, “Recurrent fusion oncogenes in carcinomas,” *Crit. Rev. Oncog.*, vol. 12, no. 3–4, 2006.
- [85] Y. Wang, M. Ji, W. Wang, Z. Miao, P. Hou, X. Chen, F. Xu, G. Zhu, X. Sun, and Y. Li, “Association of the T1799A BRAF mutation with tumor extrathyroidal invasion, higher peripheral platelet counts, and over-expression of platelet-derived growth factor-B in papillary thyroid cancer,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 15, no. 1, pp. 183–190, 2008.
- [86] S. M. Wiseman, O. L. Griffith, A. Melck, H. Masoudi, A. Gown, I. R. Nabi, and S. J. M. Jones, “Evaluation of type 1 growth factor receptor family expression in benign and malignant thyroid lesions,” *Am. J. Surg.*, vol. 195, no. 5, pp. 667–673, 2008.
- [87] U. Marti, C. Ruchti, J. Kämpf, G. A. Thomas, E. D. Williams, H. J. Peter, H. Gerber, and U. Bürgi, “Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues,” *Thyroid*, vol. 11, no. 2, pp. 137–145, 2001.
- [88] K. Westermark, M. Lundqvist, G. Wallin, T. Dahlman, G. W. Hacker, N. Heldin, and L. Grimelius, “EGF-receptors in human normal and pathological thyroid tissue,” *Histopathology*, vol. 28, no. 3, pp. 221–227, 1996.
- [89] R. Kremser, P. Obrist, G. Spizzo, H. Erler, D. Kendler, G. Kemmler, G. Mikuz, and C.

-
- Ensinger, "Her2/neu overexpression in differentiated thyroid carcinomas predicts metastatic disease," *Virchows Arch.*, vol. 442, no. 4, pp. 322–328, 2003.
- [90] B. van der Vegt, G. H. de Bock, J. Bart, N. G. Zwartjes, and J. Wesseling, "Validation of the 4B5 rabbit monoclonal antibody in determining Her2/neu status in breast cancer," *Mod Pathol*, vol. 22, no. 7, pp. 879–886, Mar. 2009.
- [91] D. R. Haugen, L. A. Akslen, J. E. Varhaug, and J. R. Lillehaug, "Expression of c-erbB-2 protein in papillary thyroid carcinomas.," *Br. J. Cancer*, vol. 65, no. 6, p. 832, 1992.
- [92] M. M. Mondi, R. Ryan, P. Ituarte, and M. Wong, "HER2 expression in thyroid tumors," *Am. Surg.*, vol. 69, no. 12, p. 1100, 2003.
- [93] D. R. F. Haugen, L. A. Akslen, J. E. Varhaug, and J. R. Lillehaug, "Expression of c-erbB-3 and c-erbB-4 proteins in papillary thyroid carcinomas," *Cancer Res.*, vol. 56, no. 6, pp. 1184–1188, 1996.
- [94] I. H. Koumakpayi, J.-S. Diallo, C. Le Page, L. Lessard, M. Gleave, L. R. Bégin, A.-M. Mes-Masson, and F. Saad, "Expression and nuclear localization of ErbB3 in prostate cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 9, pp. 2730–2737, 2006.
- [95] S. M. Wiseman, H. Masoudi, P. Niblock, D. Turbin, A. Rajput, J. Hay, S. Bugis, D. Filipenko, D. Huntsman, and B. Gilks, "Anaplastic Thyroid Carcinoma: Expression Profile of Targets for Therapy Offers New Insights for Disease Treatment," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 14, no. 2, pp. 719–729, 2006.
- [96] R. Srinivasan, C. E. Gillett, D. M. Barnes, and W. J. Gullick, "Nuclear expression of the c-erbB-4/HER-4 growth factor receptor in invasive breast cancers," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 6, pp. 1483–1487, 2000.
- [97] S. M. Tovey, B. Dunne, C. J. Witton, T. G. Cooke, and J. M. Bartlett, "HER4 in breast cancer: comparison of antibodies against intra-and extra-cellular domains of HER4," *Breast Cancer Res*, vol. 8, no. 2, p. R19, 2006.
- [98] S. M. Wiseman, N. Makretsov, T. O. Nielsen, B. Gilks, E. Yorida, M. Cheang, D. Turbin, K. Gelmon, and D. G. Huntsman, "Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival," *Cancer*, vol. 103, no. 9, pp. 1770–1777, 2005.
- [99] K. Omidfar, Z. Moinfar, A. N. Sohi, S. M. Tavangar, V. Haghpanah, R. Heshmat, S. Kashanian, and B. Larijani, "Expression of EGFRvIII in thyroid carcinoma:

- immunohistochemical study by camel antibodies,” *Immunol. Invest.*, vol. 38, no. 2, pp. 165–180, 2009.
- [100] Y. Ito, T. Kudo, Y. Takamura, K. Kobayashi, A. Miya, and A. Miyauchi, “Prognostic factors of papillary thyroid carcinoma vary according to sex and patient age,” *World J. Surg.*, vol. 35, no. 12, pp. 2684–2690, Dec. 2011.
- [101] Y. M. Lee and J. B. Lee, “Prognostic value of epidermal growth factor receptor, p53 and galectin-3 expression in papillary thyroid carcinoma,” *J. Int. Med. Res.*, vol. 41, no. 3, pp. 825–34, Jun. 2013.
- [102] B. A. Schiff, A. B. McMurphy, S. A. Jasser, M. N. Younes, D. Doan, O. G. Yigitbasi, S. Kim, G. Zhou, M. Mandal, B. N. Bekele, F. C. Holsinger, S. I. Sherman, S.-C. Yeung, A. K. El-Naggar, and J. N. Myers, “Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Is Overexpressed in Anaplastic Thyroid Cancer, and the EGFR Inhibitor Gefitinib Inhibits the Growth of Anaplastic Thyroid Cancer,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 24, pp. 8594–8602, Dec. 2004.
- [103] W. Mdah, R. Mzalbat, P. Gilbey, M. Stein, A. Sharabi, and J. Zidan, “Lack of HER-2 gene amplification and association with pathological and clinical characteristics of differentiated thyroid cancer,” *Mol. Clin. Oncol.*, vol. 2, no. 6, pp. 1107–1110, 2014.
- [104] R. Aasland, J. R. Lillehaug, and R. Male, “Expression of oncogenes in thyroid tumours: coexpression of c-erbB2/neu and c-erbB,” *Br. J. Cancer*, vol. 57, no. 4, p. 358, 1988.
- [105] J. C. Utrilla, I. Martin-Lacave, M. V San Martin, J. M. Fernandez-Santos, and H. Galera-Davidson, “Expression of c-erbB-2 oncoprotein in human thyroid tumours,” *Histopathology*, vol. 34, no. 1, pp. 60–65, 1999.
- [106] N. R. Lemoine, F. S. Wyllie, J. R. Lillehaug, S. L. Staddon, C. M. Hughes, R. Aasland, J. Shaw, J. E. Varhaug, C. L. Brown, and W. J. Gullick, “Absence of abnormalities of the c-erbB-1 and c-erbB-2 proto-oncogenes in human thyroid neoplasia,” *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, vol. 26, no. 7, pp. 777–779, 1990.
- [107] L. A. Akslen and J. E. Varhaug, “Oncoproteins and tumor progression in papillary thyroid carcinoma. Presence of epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 protein, estrogen receptor related protein, p21-ras protein, and proliferation indicators in relation to tumor recurrences and patient,” *Cancer*, vol. 76, no. 9, pp. 1643–1654, 1995.
- [108] L. A. Akslen, A. O. Myking, H. Salvesen, and J. E. Varhaug, “Prognostic impact of EGF-receptor in papillary thyroid carcinoma,” *Br. J. Cancer*, vol. 68, no. 4, p. 808, 1993.

-
- [109] S. L. Sugg, S. Ezzat, L. Zheng, I. B. Rosen, J. L. Freeman, and S. L. Asa, "Cytoplasmic staining of erbB-2 but not mRNA levels correlates with differentiation in human thyroid neoplasia," *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 49, no. 5, pp. 629–637, 1998.
- [110] L. M. Coombs, D. A. Pigott, E. Sweeney, A. J. Proctor, M. E. Eydmann, C. Parkinson, and M. A. Knowles, "Amplification and over-expression of c-erbB-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder.," *Br. J. Cancer*, vol. 63, no. 4, p. 601, 1991.
- [111] P. Soares, C. Sambade, and M. Sobrinho-Simões, "Expression of C-erb B2 in tumours and tumour-like lesions of the thyroid," *Int. J. cancer*, vol. 56, no. 3, pp. 459–461, 1994.
- [112] T. J. Giordano, R. Kuick, D. G. Thomas, D. E. Misek, M. Vinco, D. Sanders, Z. Zhu, R. Ciampi, M. Roh, and K. Shedden, "Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis," *Oncogene*, vol. 24, no. 44, pp. 6646–6656, 2005.