Analiza wybranych czynników molekularnych związanych z wysokim ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu u chorych na raka piersi

Katarzyna Sosińska-Mielcarek

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. med. Jacek Jassem

Praca finansowana przez
Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
(grant promotorski nr N N402 287336)

Klinika Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2012

“Only by means of reverence for life can we establish a spiritual and humane relationship with both people and all living creatures within our reach. Only in this fashion can we avoid harming others, and, within the limits of our capacity, go to their aid whenever they need us.”

Z książki A. Schweitzera "Cześć dla życia",
tytuł oryginału "Die Ehrfurcht vor dem Leben"

Pracę dedykuję mojej Rodzinie i Przyjaciołom

Spis treści

I. Wstęp 4
I.1. Wprowadzenie 4
I.2. Mikromacierze tkankowe 13
I.3. Charakterystyka ocenianych białek 14
II. Cele pracy 19
III. Materiał i metody 20
III.1. Materiał i opis badanych grup chorych 20
III.2. Przygotowanie mikromacierzy tkankowych 23
III.3. Badania immunohistochemiczne 23
III.3.1. Przygotowanie preparatów 23
III.3.2. Barwienia immunohistochemiczne 24
III.3.3. Ocena odczynów immunohistochemicznych 26
III.4. Analiza statystyczna 31
IV. Wyniki 32
IV.1. Ocena danych klinicznych 32
IV.2. Porównanie częstości ekspresji poszczególnych białek w obu grupach 34
IV.3. Ocena względnego ryzyka przerzutów do mózgu w zależności od ekspresji badanych białek 37
IV.4. Analiza przeżyć 44
V. Dyskusja 50
VI. Wnioski 61
VII. Streszczenie 62
VIII. Summary 64
IX. Wykaz skrótów używanych w pracy 66
IX. Piśmiennictwo 69
X. Dokumentacja fotograficzna 82

I. Wstęp

I.1. Wprowadzenie

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce. Jest również główną przyczyną zgonów u kobiet z powodu chorób nowotworowych. W 2009 roku w Polsce zarejestrowano ponad 15.700 nowych zachorowań na raka piersi oraz 5.242 zgony z tego powodu [1]. Od kilku lat prowadzone są w naszym kraju badania przesiewowe, których celem jest zmniejszenie umieralności z powodu raka piersi. W większości przypadków raka piersi przyczyna zachorowania jest nieznana. Do ważniejszych czynników ryzyka należy wiek (zachorowalność gwałtownie rośnie po 50 r.ż.), późna menopauza, wczesny wiek wystąpienia pierwszej miesiączki, długotrwałe stosowanie hormonalnej terapii zastępczej, bezdzietność lub późny wiek pierwszego porodu, narażenie na promieniowanie jonizujace, nosicielstwo mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* oraz niektóre łagodne choroby rozrostowe piersi. Dwiema najczęstszymi postaciami histopatologicznymi naciekającego raka są rak przewodowy, stanowiący ponad 80% przypadków, oraz rak zrazikowy - około 10% przypadków. Do rzadszych podtypów raka piersi należą rak cewkowy, śluzowy i rdzeniasty. Rokowanie zależy od wyjściowego stopnia zaawansowania, typu histologicznego nowotworu, stopnia złośliwości oraz molekularnych cech guza. Leczenie chorych na raka piersi jest zwykle procesem wieloetapowym, obejmującym metody chirurgiczne, radioterapię oraz leczenie systemowe (chemioterapia, hormonoterapia, terapie anty-HER2). Wskaźnik przeżyć 5-letnich w Polsce, oszacowany na podstawie danych z lat 1999-2002, wynosi 72% [1] i jest niższy niż średni wskaźnik w Europie, który sięga blisko 80% [2].

Od pewnego czasu obserwuje się powolny względny wzrost udziału chorych na raka piersi, u których rozwijają się przerzuty do mózgu. Do niedawna szacowano go na 10-16%, podczas gdy obecnie, na podstawie danych z badań autopsyjnych, udział ten u chorych, które zmarły z powodu rozsianego raka piersi, osiąga nawet 30%, a u części mózg stanowi pierwsze ognisko nawrotu [3]. Tendencja ta jest jeszcze bardziej widoczna u chorych z nadekspresją lub amplifikacją genu *HER2*, niezależnie od tego, czy otrzymują

one leczenie z udziałem przeciwciała monoklonalnego - trastuzumabu. Według niektórych źródeł przerzuty do mózgu dotyczą w tej podgrupie ponad 40% chorych [3]. Ocenia się, że u chorych z cechą HER2 ryzyko wystąpienia rozsiewu do mózgu w przypadku uogólnienia choroby ma charakter stochastyczny i rośnie stopniowo wraz z upływem czasu [4]. Podobny odsetek przerzutów do mózgu obserwuje się również wśród chorych z potrójnie ujemnym fenotypem guza pierwotnego, to jest niewykazujących ekspresji receptora estrogenowego (ER), progesteronowego (PR) oraz HER2 [5]. Wystąpieniu przerzutów do mózgu sprzyja ponadto zajęcie pachowych węzłów chłonnych, duża średnica pierwotnego guza, młodszy wiek, wczesny rozsiew do płuc i podwyższone stężenie LDH [9-10]. Istnieje także ryzyko, że w przebiegu leczenia nowotworu zlokalizowanego poza OUN może dochodzić do powstawania klonów komórkowych opornych na leczenie, z większą zdolnością do zasiedlania mózgu [11]. Bada się też wpływ stosowania leków nowej generacji, w tym taksoidów oraz przeciwciała monoklonalnego anty-HER2 – trastuzumabu [6-11]. Od pewnego czasu duży niepokój budził wzrost odsetka przerzutów do mózgu rozpoznawanych u chorych, które otrzymywały trastuzumab zarówno w leczeniu uzupełniającym, jak i w okresie rozsiewu, w porównaniu do historycznych danych. W metaanalizie, która objęła badania kliniczne z udziałem trastuzumabu w pooperacyjnym leczeniu chorych na raka piersi, ryzyko wystąpienia przerzutów do mózgu w grupie otrzymującej ten lek było znamiennie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (p=0,033) [12]. Początkowo sądzono, że przyczyną tego zjawiska jest sam trastuzumab. Podejrzewano również, że w przebiegu choroby może dochodzić do zmiany ekspresji HER2 w ogniskach przerzutowych w mózgu i związanej z tym oporności na leczenie. W większości doniesień analiza porównawcza stanu ekspresji HER2 w guzie pierwotnym i przerzutach wykazała jednak dużą zgodność [13]. Zaobserwowano również, że rozwój przerzutów w tej lokalizacji może być wynikiem niskiego stężenia trastuzumabu w płynie mózgowo-rdzeniowym. Jest to związane z istnieniem bariery krew-mózg, ograniczającej przenikanie przeciwciała o dużej masie cząsteczkowej (145 kDa) do płynu mózgowo-rdzeniowego i niedostępnością tego miejsca (ang. *„sanctuary site”*) dla leku [14]. Wydaje się więc, że wzrost

liczby klinicznie jawnych przerzutów do mózgu w tej grupie chorych jest spowodowany lepszą kontrolą pozaczaszkowych ognisk choroby i związanym z tym wydłużeniem całkowitego przeżycia, co daje więcej czasu na rozwinięcie się przerzutów w tym narządzie. Ponadto zwiększyła się dostępność badań obrazowych, takich jak rezonans magnetyczny (MRI) czy tomografia komputerowa (TK), które umożliwiają wykrycie zmian w mózgu przed wystąpieniem objawów klinicznych. Dotyczy to szczególnie MRI, którego czułość jest większa i pozwala na lepszą ocenę tylnego dołu czaszki oraz opon mózgowo-rdzeniowych [15]. Z tego powodu w grupach wysokiego ryzyka podejmowane były próby wykrywania i wczesnego leczenia bezobjawowych przerzutów do mózgu. Dotychczasowe wyniki wskazują jednak, że skuteczność takiego postępowania jest wątpliwa [16].

Średni czas od rozpoznania raka piersi do pojawienia się przerzutów w mózgu wynosi 34 miesiące [17]. W większości przypadków mają one charakter mnogi, pojedyncze ogniska dotyczą zaledwie 15–25% chorych [18]. Około 80% przerzutów do mózgu występuje u chorych, u których doszło już wcześniej do rozsiewu [19], najczęściej w narządach trzewnych, zwłaszcza płucach i wątrobie. Wiąże się to z dominującą krwiopochodną drogą powstawania przerzutów w raku piersi. Rola układu chłonnego w rozsiewie jest ograniczona w związku z niewielką dostępnością naczyń limfatycznych w mózgowiu.

Wystąpienie przerzutów do mózgu w istotny sposób pogarsza jakość życia chorych. Objawy zależą od lokalizacji ognisk wtórnych, przy czym w 80% stwierdza się je w półkulach, 15% w móżdżku, 5% w pniu mózgu i w 2–5% w oponach mózgowo-rdzeniowych [18]. Do najczęstszych objawów należą bóle głowy, nudności i wymioty, padaczka, osłabienie siły mięśniowej, niedowład, ogniskowe objawy neurologiczne, zaburzenia widzenia, zmiany zachowania [20].

Rokowanie u chorych z przerzutami do mózgu jest niekorzystne. Istnieją skale prognostyczne (np. RPA, GPA, BSBM, SIR), dzięki którym można na podstawie danych klinicznych, w tym molekularnego podtypu guza, stanu ogólnego, wieku, liczby ognisk wtórnych w mózgu czy stopnia kontroli

pozaczaszkowych ognisk choroby, wyodrębnić chore o lepszym rokowaniu, u których uzasadnione jest bardziej agresywne postępowanie [21, 22]. Średni czas przeżycia bez leczenia po ujawnieniu się przerzutów do mózgu wynosi od 1 do 2 miesięcy, a po zastosowaniu paliatywnej radioterapii od 3 do 6 miesięcy. Najlepsze wyniki można osiągnąć stosując resekcję chirurgiczną lub stereotaktyczną radioterapię, najczęściej w połączeniu z napromienianiem całego mózgowia, ale postępowanie to jest możliwe wyłącznie u chorych w dobrym stanie ogólnym, z pojedynczymi ogniskami przerzutowymi w mózgu [23]. Mediana czasu przeżycia w tej grupie zawarta jest w granicach od 10 do 16 miesięcy [24, 25]. Dłuższy czas przeżycia obserwuje się paradoksalnie u chorych z HER2-dodatnim guzem leczonych trastuzumab, w porównaniu do chorych z guzem HER2-ujemnym lub HER2-dodatnim, u których nigdy nie stosowano tego przeciwciała [26]. Uważa się, że jest to spowodowane lepszą kontrolą pozaczaszkowych ognisk choroby w wyniku stosowania trastuzumabu. Korzystnie na rokowanie wpływa również dobry stan ogólny, wiek poniżej 60 lat, brak przerzutów poza OUN i długi czas od pierwotnego leczenia do rozpoznania przerzutów do mózgu [22, 24]. Rola systemowego leczenia przerzutów do mózgu pozostaje nadal ograniczona. Wynika to przede wszystkim z istnienia bariery krew-mózg, która z uwagi na swoją budowę stanowi fizyczną przeszkodę, ograniczającą przenikanie ksenobiotyków do mózgu. Mimo że jej integralność może zostać naruszona przez przedostające się przez nią komórki nowotworowe tworzące przerzuty oraz radioterapię, większość leków cytotoksycznych stosowanych w raku piersi, w tym antracykliny, alkaloidy *vinca* czy taksoidy, praktycznie nie przedostaje się do krążenia mózgowego. Dotyczy to również trastuzumabu, który osiąga wielokrotnie (300-420 razy) niższe stężenie w płynie mózgowo-rdzeniowym niż w surowicy [27, 28]. Duże nadzieje wiązano z lapatynibem, drobnocząsteczkowym inhibitorem kinazy tyrozynowej, ukierunkowanym na receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) i HER2, który z uwagi na swoją niską masę cząsteczkową częściowo przenika przez barierę krew-mózg. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań wykazały jednak umiarkowaną aktywność tego leku w monoterapii przerzutów do mózgu [29]. Doświadczenia na modelach zwierzęcych wykazały, że jego stężenie w przerzutach do mózgu

stanowiło jedynie 10–20% obserwowanego w pozaczaszkowych przerzutach [30]. Pewne nadzieje wiąże się również z lekami z grupy inhibitorów PARP. Obecnie toczy się miedzy innymi badanie II fazy (NCT01173497) z udziałem dożylnego iniparibu w połączeniu z irynotekanem u chorych z przerzutami do mózgu w przebiegu potrójnie ujemnego raka piersi – postaci o szczególnie wysokiej skłonności do tworzenia przerzutów w tym narządzie.

Do tej pory nie udało się dokładnie poznać mechanizmów związanych z powstawaniem przerzutów do mózgu. Wydaje się jednak, że nie jest to proces przypadkowy i zgodnie z hipotezą ziarna i gleby (ang. *„seed and soil”*) tylko wybrane klony komórkowe guza pierwotnego („ziarno”) mają zdolność do przedostania się i zasiedlenia danego narządu („gleba”) [31]. Proces ten jest wieloetapowy. Rozpoczyna się od miejscowego naciekania pierwotnego guza, następnie przedostania się komórek nowotworowych do światła naczyń krwionośnych, gdzie muszą one przetrwać w układzie krążenia, po czym przeniknięcia do danego narządu, w którym przy sprzyjających warunkach następuje proces ich zasiedlenia [32]. Wymaga to dużych zdolności przystosowawczych komórek nowotworowych. W odniesieniu do mózgu dodatkowym utrudnieniem jest istnienie bariery krew-mózg, która odpowiada za wybiórczość procesów związanych z wymianą (transportem) pomiędzy łożyskiem naczyniowym a tkankami ośrodkowego układu nerwowego. Bariera krew-mózg zbudowana jest ze ściśle ze sobą połączonych, pozbawionych fenestracji komórek endotelium, błony podstawnej oraz przylegających do niej pericytów i wypustek astrocytów, tworzących wzmocnienie całej konstrukcji [33]. Cechują ją mała przepuszczalność dla jonów i drobnych cząsteczek, uniemożliwiająca przedostanie się substancji o dużej masie cząsteczkowej. Dodatkowym czynnikiem utrudniającym przenikanie wielu leków przez tę barierę jest obecność glikoproteiny P, kodowanej przez geny związane z opornością wielolekową *MDR1* i *MDR2*. Konfrontacja komórek guza z komórkami śródbłonka naczyń włosowatych, stanowiących anatomiczny wykładnik bariery krew-mózg, a następnie z elementami lokalnego mikrośrodowiska (astrocytami, komórkami gleju) oraz białkami układu sygnałowego, wyzwala szereg reakcji, których mediatorami są obecne na powierzchni komórek receptory, ich ligandy oraz cytokiny [34]. Ich dokładne

poznanie, ze szczególnym uwzględnieniem białek receptorowych, może w przyszłości ułatwić wczesną identyfikację chorych o dużym ryzyku rozsiewu do mózgu.

Do tej pory opisano niewiele białek, których ekspresja w obrębie nowotworu byłaby związana ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu. Wśród nich znalazły się między innymi nieobecność ekspresji receptora estrogenowego i progesteronowego [35] oraz nadmierna ekspresja receptorów dla rodziny naskórkowego czynnika wzrostu - HER2 [36-38], EGFR [39] i HER3 [40-42], jednak dokładny mechanizm opisujący ich udział w powstawaniu przerzutów do mózgu wciąż nie został w pełni poznany**.** Ponadto pojawiły się doniesienia o zwiększonej ekspresji chemokin związanych z migracją komórek nowotworowych: CXCR4 i jego ligandu CXCL12 [43] oraz CX3CR1 [44]. W grupie białek ryzyka wymienia się także chemokiny z rodziny Slit (Slit1, 2, 3), wraz z odpowiadającymi im receptorami Robo (Robo 1, 2, 3 i 4), które odgrywają ważną rolę w rozwoju układu nerwowego. W badaniach *in vitro* zaobserwowano, że cytokina Slit2, działając przez szlak sygnałowy Slit-Robo, może wywoływać bezpośrednią migrację do mózgu komórek raka piersi, w których doszło do ekspresji receptora Robo [45]. Kolejnym białkiem związanym z ryzykiem przerzutów do mózgu jest naczyniowy czynnik wzrostu (VEGF), który poprzez zmniejszenie integralności śródbłonka i zwiększenie adhezyjności komórek guza do śródbłonka mikrokronaczyń mózgowych, może wpływać na przezbłonową migrację tych komórek [46]. Pewną rolę przypisuje się również wybranym metaloproteinazom macierzy (ang. *matrix metalloproteinases*): MMP1, MMP2, MMP3 i MMP9, które między innymi ułatwiają przenikanie bariery krew-mózg. W badaniach na modelach zwierzęcych komórki raka piersi, które tworzyły przerzuty do mózgu, wykazywały zwiększoną ekspresję tych enzymów w porównaniu do komórek kontrolnych [47]. Pojawiły się również próby identyfikacji molekularnego profilu związanego z wysokim ryzykiem przerzutów w tej lokalizacji. Duże zainteresowanie wzbudziła praca Bos i wsp. [48], w której w analizie jednoczynnikowej ekspresja 17 genów była związana ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu. W końcowej analizie zidentyfikowano 3 geny, których produkty biorą udział w pasażu komórek nowotworowych przez

barierę krew-mózg. Należą do nich cyklooksygenaza 2 (COX2) i ligand dla EGFR – HB-EGFR, które ułatwiają komórkom nowotworowym przedostawanie się przez barierę krew-mózg, a także α2,6sialyltransferaza (ST6GALNAC5), która wpływa na ich zdolności adhezyjne i możliwość naciekania śródbłonka naczyniowego w mózgu.

Co ciekawe, 7 genów z „profilu mózgowego": *COX-2*, *MMP1*, *ANGPTL4*, *LTBP1*, *FSCN1*, *HBEGF* i *EREG* było wspólnych dla opublikowanego wcześniej 18-genowego „profilu płucnego", związanego z podwyższonym ryzykiem rozsiewu do płuc [49], który zwykle poprzedza pojawienie się przerzutów w mózgu.

Interesujące wyniki uzyskali również Duchnowska i wsp. [50], którzy u chorych na rozsianego raka piersi z nadekspresją lub amplifikacją genu *HER2*, dokonali analizy ekspresji genów na poziomie RNA w kontekście ryzyka rozsiewu do mózgu. Grupa ta wyodrębniła 13 genów (*CDK4*, *CCNC*, *PTK2*, *MYC*, *BARD1*, *RAD 51*, *FANCG*, *PCNA*, *PRCC*, *TPR*, *EMS1*, *DSP*, *HDGF*), których ekspresja związana była z wysokim ryzykiem wystąpienia wczesnych przerzutów do mózgu. Profil molekularny obejmujący wymienione geny zwiększał ryzyko przerzutów do mózgu ponad pięciokrotnie w stosunku do pozostałych chorych z nadekspresją lub amplifikacją genu *HER2*. Walidacja tego profilu, przeprowadzona na niezależnej grupie chorych z nadekspresją lub amplifikacją genu *HER2*, potwierdziła jego predykcyjną wartość w ocenie ryzyka wystąpienia wczesnych przerzutów do mózgu [51]. Dodatkowo w badaniach na ludzkich liniach komórkowych autorzy ci wykazali, że nadekspresja RAD51 może zwiększać inwazyjność komórek nabłonkowych gruczołu piersiowego w większym stopniu niż nadekspresja HER2, oraz może być wykładnikiem progresji raka piersi na wczesnym etapie jego rozwoju.

Duży postęp dokonał się również dzięki wprowadzeniu nowej klasyfikacji raka piersi, opartej na molekularnym profilu pierwotnego guza [52]. Założono, że punktem wyjścia komórek nowotworowych są dwa typy nabłonka, które w prawidłowych warunkach są obecne w gruczole piersiowym: nabłonek podstawny oraz luminalny. Zaobserwowano, że oba typy nabłonka dzieli odmienny profil immunohistochemiczny (m. in. różna ekspresja cytokeratyn).

Na tej podstawie, dzięki technice mikromacierzy DNA, udało się wyodrębnić cztery podtypy raka piersi: ER-dodatni, przypominający nabłonek luminalny (*luminal-like*), przypominający nabłonek podstawny (*basal-like*), HER2-dodatni i przypominający tkankę prawidłowego gruczołu piersiowego [52]. W celu uproszczenia tej klasyfikacji i umożliwienia jej wykorzystania w praktyce klinicznej, na podstawie oceny markerów dostępnych w rutynowej diagnostyce immunohistochemicznej – ER, PR, HER2 i wskaźnika proliferacji Ki67, wyróżniono podtyp luminalny A z dodatnim ER, o niskim wskaźniku proliferacji Ki67 (<14%), podtyp luminalny B w którym ekspresji receptorów hormonalnych towarzyszy wyższy stopień proliferacji Ki67 (≥14%) lub obecność cechy HER2, podtyp HER2-dodatni nieluminalny - bez ekspresji receptorów hormonalnych, z nadekspresją lub amplifikacją HER2 (ang. *HER2 enriched*) oraz podtyp potrójnie ujemny (ang. *triple negative*), niewykazujący ekspresji receptorów: ER, PR i HER2. W obrębie tej ostatniej grupy można dodatkowo wyróżnić podtyp podstawny (ang. *basal-like*), charakteryzujący się poza wymienionymi cechami, dodatkowo ekspresją cytokeratyn bazalnych (CK5/6) oraz receptora EGFR [52-54]. Postacie te różnią się częstością występowania, przebiegiem klinicznym oraz wrażliwością na systemowe leczenie. Najgorsze rokowanie przypisywane jest podtypowi podstawnemu oraz HER2-dodatniemu. Oba związane są również z wysokim ryzykiem wystąpienia przerzutów do płuc i mózgu [55-58]. Co ciekawe, obserwuje się pomiędzy nimi różnice w patomechanizmie tworzenia przerzutów do mózgu. Wydaje się, że w pierwszym przypadku dochodzi zazwyczaj do zniszczenia bariery krew-mózg, natomiast w drugim stwierdza się większą tendencję do jej zachowania. Dane kliniczne wskazują, że u chorych na raka potrójnie ujemnego przebieg choroby jest bardziej agresywny i szybciej dochodzi do powstania przerzutów w porównaniu do chorych na raka HER2-dodatnego [59]. Podtypy luminale, w odróżnieniu od pozostałych postaci, charakteryzują się lepszym rokowaniem, wrażliwością na leczenie hormonalne oraz większą skłonnością do rozsiewu do kości. W 2007 roku, spośród raków potrójnie ujemnych został wyodrębniony nowy podtyp raka piersi, *claudin-low* [60, 61]. Oprócz braku ekspresji receptorów hormonalnych i HER2, charakteryzuje go niska ekspresja genów zaangażowanych w procesy adhezyjne komórek – klaudyny 3, 4, 7

i E-kadheryny. Klinicznie wyróżnia się on agresywnym przebiegiem i opornością na systemowe leczenie oraz radioterapię. Molekularny obraz podtypu *claudin-low* zwrócił uwagę na istnienie pewnej hierarchii, przypominającej kaskadę zdarzeń towarzyszącą rozwojowi prawidłowego nabłonka gruczołu piersiowego. Na podstawie wymienionych powyżej podtypów, a także profilu molekularnego prawidłowych komórek macierzystych (progenitorów) oraz dojrzałych komórek luminalnego nabłonka gruczołu piersiowego, stworzona została metoda ilościowej oceny stopnia zróżnicowania komórek nabłonkowych tego narządu (ang. *differentiation score predictor,* DSP). System ten opiera się na założeniu, że macierzyste komórki gruczołu piersiowego są najmniej zróżnicowane i z nich wywodzą się progenitory luminalnego nabłonka. Z kolei z tego nabłonka rozwija się następnie dojrzały, hormonowrażliwy nabłonek wydzielniczy o najwyższym współczynniku zróżnicowania (ang. *differentiation score,* DS). Poszczególne molekularne podtypy znajdują się więc na osi pomiędzy najmniej i najbardziej dojrzałymi komórkami gruczołu piersiowego. W tej skali guzy o fenotypie *claudin-low* posiadają najniższy DS i są najbardziej zbliżone do komórek pnia (ang. *stem cells*). Jako kolejny wymienia się podtyp bazalny, następnie HER2-dodatni, a na końcu luminalny B i luminalny A. Według Harella i wsp. [62], w związku z potwierdzonym klinicznie wysokim ryzykiem rozwoju przerzutów do mózgu u chorych z podtypem *claudin-low* i bazalnym, im niższy jest DS, tym wyższe jest ryzyko rozsiewu do mózgu. Obu wymienionym powyżej podtypom molekularnym raka piersi przypisuje się również związek ze zjawiskiem zmiany fenotypu nabłonkowego na mezenchymalny (*epithelial–mezenchymal transition*, EMT), procesem który prawdopodobnie leży u podstaw mechanizmów odpowiedzialnych za nabycie przez komórkę nowotworową zdolności do rozsiewu. Molekularne podstawy EMT nie zostały jeszcze w pełni poznane. Przyjmuje się, że w prawidłowych warunkach zjawisko to w życiu płodowym umożliwia zdrowym komórkom aktywne przemieszczanie się w trakcie organogenezy. Uruchomienie EMT, miedzy innymi pod wpływem czynników wzrostu wydzielanych w otoczeniu guza, takich jak HGF, PDGF, EGF i TGFβ, czy hipoksji, prowadzi do zmiany fenotypu komórek nowotworowych z nabłonkowego na mezenchymalny. Skutkiem tego jest utrata polarności, zdolności adhezyjnych oraz nabycie umiejętności przemieszczania

się, co w sumie prowadzi do powstawania przerzutów. Wśród głównych molekularnych markerów procesu EMT wymienia się utratę ekspresji E-kadheryny oraz białek z grupy klaudyn i okludyn [63, 64, 65].

I.2. Mikromacierze tkankowe

Technika mikromacierzy tkankowych po raz pierwszy została opisana w 1987 roku. W ostatnich 10 latach metoda ta znalazła szerokie zastosowanie, szczególnie w badaniach immunohistochemicznych nad nowymi markerami rokowniczymi i predykcyjnymi [66]. Umożliwia ona umieszczenie na pojedynczym szkiełku podstawnym materiału tkankowego od wielu dziesiątek, a nawet setek chorych. W pierwszym etapie patolog dokonuje pod mikroskopem oceny całego skrawka wybarwionego hematoksyliną i eozyną, tak aby wyznaczyć do dalszej analizy najbardziej właściwy, pozbawiony ognisk martwicy obszar nowotworu. Następnie, za pomocą specjalnej igły z materiału utrwalonego w formalinie i zatopionego w parafinie - tzw. „dawcy", pobierany jest mały, cylindryczny rdzeń o średnicy od 0,6 do 2 mm, który w kolejnym etapie umieszczany jest we wcześniej przygotowanym otworze znajdującym się w parafinowym bloku zwanym „biorcą". Aby zapewnić większą reprezentatywność badanego materiału i zmniejszyć prawdopodobieństwo nieuzyskania wyniku z powodu utraty tkanki w procesie wybarwiania, zwykle dla każdego przypadku pobierane są co najmniej dwa rdzenie. Oprócz tego tworzona jest mapa, zawierająca informacje o położeniu danego materiału w bloku, co pozwala go szybko zidentyfikować. Gdy proces gromadzenia materiału zostaje zakończony, za pomocą mikrotomu uzyskuje się skrawki do badań, zawierające zwykle od 50 do 150 przypadków [67]. Technika mikromacierzy tkankowych, dzięki zgromadzeniu na jednym szkiełku materiału pochodzącego od różnych chorych, znacznie skraca czas barwienia i oceny, oszczędza materiał tkankowy i ilość zużywanych odczynników, umożliwia przeprowadzenie badań w jednolitych warunkach i przy takich samych rozcieńczeniach stosowanych przeciwciał. Głównym zarzutem stawianym przez przeciwników tej metody jest niewielka ilość badanego materiału i związane z tym ryzyko nieadekwatnej

oceny ekspresji analizowanych biomarkerów, wynikające z potencjalnej heterogenności tkanki guza. Większość przeprowadzonych badań porównawczych wskazuje jednak na wysoką zgodność wyników ocenianych w mikromacierzach i w pełnych skrawkach guza [68].

I.3. Charakterystyka ocenianych białek

Wyboru białek do analizy immunohistochemicznej dokonano na podstawie dostępnego piśmiennictwa. Oprócz ich potencjalnego związku ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu, uwzględniono również dostępność przeciwciał i techniczne możliwości wykonania oznaczeń na materiale utrwalonym w formalinie i zatopionym w parafinie.

Receptor estrogenowy i progesteronowy (ER i PR)

Receptor estrogenowy (ER) i progesteronowy (PR) są zlokalizowane w jądrze komórkowym. Należą one do rodziny białek transkrypcyjnych, tj. mogących inicjować transkrypcję genów w odpowiedzi na działanie hormonów, w tym estrogenów i progesteronu. Pod wpływem hormonalnych czynników wzrostu, pośredniczą one w pobudzaniu proliferacji komórek raka piersi, hamują proces ich apoptozy, jednocześnie zwiększając ich zdolności adhezyjne i migracyjne. Z uwagi na swoją rokowniczą i predykcyjną wartość, należą one do panelu białek rutynowo ocenianych w trakcie histopatologicznej diagnostyki raka piersi. Ustalenie ich ekspresji jest również niezbędne przy kwalifikacji do określonego podtypu molekularnego. Ekspresja tych receptorów zwykle wiąże się z korzystnym rokowaniem i względną skłonnością do rozsiewu do kości. Z kolei nieobecność tej cechy związana jest ze zwiększonym ryzykiem rozsiewu do narządów trzewnych, w tym mózgu [35].

HER2

HER2 należy do rodziny receptorów dla naskórkowego czynnika wzrostu. Podobnie jak pozostałe białka „rodziny HER", zbudowany jest z trzech części: domeny zewnątrzkomórkowej, odpowiadającej za swoiste wiązanie receptora

z ligandem, domeny przezbłonowej, kotwiczącej receptor w błonie, oraz części cytoplazmatycznej, posiadającej aktywność kinazy tyrozynowej. W wyniku aktywacji HER2, za pośrednictwem kinazy tyrozynowej dochodzi do fosforylacji reszty tyrozynowej w jego wewnątrzkomórkowej części, co inicjuje przekazanie sygnałów do jądra komórkowego. Efektem jego pobudzenia jest aktywacja proliferacji komórkowej, angiogenezy i migracji oraz zahamowanie procesu apoptozy, co sprzyja rozwojowi nowotworu. Nadekspresja lub amplifikacja genu *HER2* występuje u około 20% chorych na raka piersi. Cechy te związane są z gorszym rokowaniem, w tym ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu. Odsetek ten, według niektórych doniesień, sięga nawet 40% [3, 36-38]. Ocenia się, że ryzyko wystąpienia rozsiewu do mózgu w przypadku uogólnienia choroby rośnie w tej grupie systematycznie wraz z upływem czasu.

Ki 67

Ki67 jest markerem proliferacyjnej aktywności komórki. Należy do niehistonowych białek jądrowych. Po raz pierwszy został opisany w 1983 r. przez Gerdes i wsp. [69]. Nasilenie jego ekspresji różni się w zależności od fazy cyklu komórkowego. Jest niski w fazie G1 i wczesnej S i stopniowo narasta, osiągając maksimum w trakcie mitozy. Ki67 uznawany jest za niezależny czynnik rokowniczy – jego silna ekspresja wiąże się z gorszym rokowaniem [53, 70].

CK5/6

Cytokeratyny bazalne CK5/6 należą do filamentów pośrednich budujących cytoszkielet i chroniących komórkę przed mechanicznymi uszkodzeniami. W zdrowym gruczole piersiowym znajdują się one w komórkach warstwy podstawnej przewodów mlekowych. Są jednym z kluczowych markerów podtypu bazalnego (podstawnego) raka piersi, który wiąże się z wysokim ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu [54, 71].

CXCR4

CXCR4 jest receptorem przezbłonowym. Nasilenie jego ekspresji w zdrowych komórkach gruczołu piersiowego jest dużo niższe niż w komórkach

nowotworowych. Stwierdzono również, że jest on związany z wyższym stopniem złośliwości histologicznej, gorszym rokowaniem oraz zwiększonym ryzykiem rozsiewu do węzłów chłonnych i odległych narządów [72]. CXCR4 jest receptorem dla wytworzonej miedzy innymi w mózgu hemokiny CXCL12, która bierze udział w procesach migracji, proliferacji, angiogenezy i aktywacji wielu rodzajów komórek [43, 73, 74]. Badania na doświadczalnych modelach wykazały, że zablokowanie reakcji pomiędzy CXCR4 a CXCL12 może prowadzić do zahamowania rozsiewu w mózgu oraz migracji komórek nowotworowych przez barierę krew-mózg. Zaobserwowano też związek pomiędzy ekspresją HER2 i CXCR4. Wydaje się, że nadmierna ekspresja HER2 nasila ekspresję CXCR4 poprzez pobudzenie translacji tego białka i zaburzenie procesów degradacji. Wiele też wskazuje na to, że CXCR4 odgrywa jedną z kluczowych ról w procesie tworzenia przerzutów w HER2-dodatnim raku piersi [74].

EGFR

EGFR należy do rodziny receptorów dla naskórkowego czynnika wzrostu. Białko to bierze udział w kontroli wzrostu komórki, jej różnicowania, ruchliwości i zdolności adhezyjnych. Dane przedkliniczne sugerują, że ekspresja EGFR może mieć związek z wczesnym rozwojem i progresją raka piersi. Cecha ta wiązana jest z większą inwazyjnością nowotworu i podwyższonym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu [39]. Ekspresja EGFR i CK5/6 wiąże się z bazalnym podtypem raka piersi [71].

RAD51

RAD51 należy do białek odpowiadających za procesy naprawcze uszkodzeń DNA. Odgrywa ono istotną rolę w rekombinacji homologicznej oraz tworzeniu kompleksu niezbędnego do naprawy podwójnych pęknięć DNA i utrzymywania stabilności genomu. Zwiększona ekspresja RAD51 może prowadzić do oporności na chemioterapię, w tym na pochodne platyn oraz na radioterapię [75]. Zaburzenia w ekspresji RAD51 współwystępują z dziedzicznym rakiem piersi z obecnością mutacji genu *BRCA2* oraz są częstsze w rakach potrójnie ujemnych. Zaobserwowano także, że nadmierna ekspresja RAD51 związana jest z podwyższonym ryzykiem nawrotu choroby,

wystąpienia przerzutów do odległych narządów oraz krótszym czasem całkowitego przeżycia [76, 77]. *RAD51* znalazł się również wśród wymienionych wcześniej 13 genów, których ekspresja u chorych na HER2-dodatniego raka piersi związana była z wysokim ryzykiem wystąpienia wczesnych przerzutów do mózgu [50, 51].

E-kadheryna

E-kadheryna należy do przezbłonowych białek, które pełnią funkcje adhezyjne oraz odpowiadają za polarność komórek nabłonkowych. Zniesienie funkcji adhezyjnych w kontaktach międzykomórkowych prowadzi do zwiększenia migracji i proliferacji komórek, a co za tym idzie - inwazyjności i zdolności do powstawania przerzutów. Przyjmuje się, że utrata ekspresji E-kadheryny jest markerem zmiany fenotypu z nabłonkowego na mezenchymalny, związany z agresywnym przebiegiem choroby [78]. Asgeirsson i wsp. [79] zaobserwowali, że obniżona ekspresja tego białka w komórkach raka piersi, szczególnie u chorych z cechą N0, może się wiązać z podwyższonym ryzykiem nawrotu choroby, niezależnie od typu histologicznego nowotworu. Potwierdziła to metaanaliza badań, w których analizowano związek pomiędzy ocenianym immunohistochemicznie nasileniem ekspresji E-kadheryny a klinicznym przebiegiem raka piersi [80]. E-kadheryna jest również jednym z kluczowych markerów podtypu *claudin-low*, związanego z wysokim ryzykiem rozsiewu do mózgu [62].

Klaudyna 3 i 4

Klaudyny należą do grupy białek, które tworzą między komórkami tzw. ścisłe połączenia (ang. *tight junctions*). Stanowią one barierę regulującą przepływ jonów, białek i lipidów. Przypisuje im się również pewną rolę w powstawaniu i działaniu bariery krew-mózg. Ich niska ekspresja związana jest z fenotypem podtypu *claudin-low* raka piersi [62, 61, 81].

HER3

HER3 należy do rodziny receptorów dla naskórkowego czynnika wzrostu. Białko to jest partnerem dla receptora HER2 w procesie jego heterodimeryzacji i razem tworzą parę o największym potencjale pobudzania podziałów

komórkowych (mitozy) wśród białek należących do tej rodziny. W badaniach na liniach komórkowych raka piersi zaobserwowano, że w komórkach z nadmierną ekspresją HER2 zablokowanie HER3 prowadziło do takiego samego zahamowania proliferacji, jak unieczynnienie HER2. Stwierdzono również, że nadmierna ekspresja HER3 wiąże się z gorszym rokowaniem i krótszym czasem przeżycia [41]. Ponadto Da Silva i wsp. [42] w badaniach nad mechanizmami prowadzącymi do rozsiewu do mózgu w przebiegu raka piersi, opisali zwiększoną aktywność HER3 i związanych z nim białek wewnątrzkomórkowego szlaku przekazywania sygnału w przerzutach do mózgu. Stwierdzono również wysoką zgodność pomiędzy nadmierną ekspresją HER3 w guzie pierwotnym i w odpowiadających mu przerzutach w mózgu [42].

Uzasadnienie celowości prowadzonych badań

Przerzuty do mózgu stanowią rosnący problem kliniczny. Ze względu na swój charakter, wzrasta ich względny udział wśród przyczyn zgonów z powodu raka piersi. Większość dotychczasowych badań obejmowała głównie kliniczne i patomorfologiczne cechy predysponujące do powstawania przerzutów do mózgu. Podjęto miedzy innymi próby stworzenia nomogramu, który na podstawie wybranych danych klinicznych pozwala oszacować indywidualne ryzyko rozwoju przerzutów do mózgu u chorych na rozsianego raka piersi [82]. Z uwagi na małą swoistość, opisywane modele kliniczne nie pozwalają jednak wyodrębnić chorych z bardzo wysokim ryzykiem przerzutów do mózgu, u których można byłoby na przykład rozważać badania przesiewowe w kierunku ich wykrycia w bezobjawowej fazie lub profilaktyczne leczenie. W niniejszej pracy podjęto więc próbę zbadania grupy białek potencjalnie związanych z wysokim ryzykiem rozsiewu do mózgu u chorych na raka piersi i stworzenia profilu opartego na modelu ich ekspresji, określającego ryzyko wystąpienia tego zdarzenia.

II. Cele pracy

1. Ocena związku pomiędzy ekspresją wybranych białek w pierwotnym raku piersi a ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu.
2. Stworzenie profilu molekularnego opartego na modelu ekspresji badanych białek, umożliwiającego wyodrębnienie chorych na raka piersi o wysokim ryzyku wystąpienia przerzutów do mózgu.
3. Ocena zależności pomiędzy podtypem molekularnym raka piersi a ryzykiem przerzutów do mózgu.

III. Materiał i metody

III.1. Materiał i opis badanych grup chorych

Badaniem objęto 198 chorych na rozsianego raka piersi leczonych w latach 2001-2007, w tym 96 chorych, u których doszło do przerzutów do mózgu (grupa badana) oraz 102 chore, u których na podstawie obrazu klinicznego, badań obrazowych i autopsyjnych, do końca życia nie rozpoznano przerzutów w tej lokalizacji (grupa kontrolna). Chore te pochodziły z Wojewódzkiego Centrum Onkologii w Gdańsku, Kliniki Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz ośrodków onkologicznych w Opolu, Bydgoszczy, Warszawie, Łodzi, Wrocławiu, Gliwicach, Szczecinie, Olsztynie, Gdyni i Poznaniu. Informacje na temat przebiegu choroby uzyskano na podstawie danych z historii chorób. Na prowadzenie badań w ramach przewodu doktorskiego uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr zgody: NKEBN/196/2008, wydana na posiedzeniu z dnia 25.06.2008r.). Badanie było finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant promotorski nr N N402 287336).

W klasyfikacji przerzutów stosowano zasadę „dominujacej lokalizacji", według której za najlepiej rokujące uznaje się przerzuty do tkanek miękkich, pośrednio rokujące - przerzuty do kości i najgorzej rokujące – przerzuty do narządów wewnętrznych. Na tej podstawie wydzielono 3 kategorie przerzutów:

a) przerzuty do tkanek miękkich, obejmujące chore bez przerzutów do kości lub narządów wewnętrznych;

b) przerzuty do kości – chore z przerzutami do kości, niezależnie od obecności przerzutów do tkanek miękkich, ale bez przerzutów do narządów wewnętrznych

c) przerzuty do narządów wewnętrznych – wszystkie chore z przerzutami do narządów wewnętrznych, niezależnie od lokalizacji innych ognisk rozsiewu.

Charakterystykę kliniczną obu grup przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka kliniczna chorych

Cecha	Grupa z przerzutami do mózgu (N=96)		Grupa bez przerzutów do mózgu (N=102)		Razem*
	N	%	N	%	
Wiek w chwili rozpoznania choroby					
Średnia	52		60		56
Przedział	24-72		32-87		24-87
Stan menopauzalny					
Po menopauzie	44	48	67	68	111
Przed menopauzą	48	52	32	32	80
Wyjściowy stopień zaawansowania klinicznego					
I	5	5	5	5	10
II	35	37	41	40	76
III	48	51	49	48	97
IV	7	7	7	7	14
Typ histologiczny raka piersi					
Przewodowy	73	76	88	86	161
Zrazikowy	17	18	8	8	25
Przewodowo-zrazikowy	0	0	4	4	4
Pozostałe	6	6	2	2	8
Stopień złośliwości histologicznej					
G1	2	2	1	1	3
G2	43	49	50	71	93
G3	43	49	19	28	62
Leczenie operacyjne					
Amputacja piersi	79	87	90	90	169
Zabieg oszczędzający	3	3	1	1	4
Nie stosowano leczenia chirurgicznego	9	10	9	9	18

Radioterapia					
W leczeniu uzupełniającym	32	34	35	39	67
Leczenie radykalne	0	0	0	0	0
Leczenie paliatywne	37	39	22	24	59
W leczeniu wczesnego i rozsianego raka piersi	25	26	13	14	38
Nie stosowano radioterapii	1	1	21	23	22
Chemioterapia					
W leczeniu indukcyjnym lub uzupełniającym	22	23	11	11	33
Wyłącznie w chorobie rozsianej	15	16	17	17	32
W leczeniu wczesnego i rozsianego raka piersi	55	59	69	70	124
Nie stosowano chemioterapii	2	2	2	2	4
Chemioterapia indukcyjna					
Antracykliny	24	60	24	75	24
Antracykliny z taksoidami	9	23	1	3	10
Inne	7	17	7	22	14
Hormonoterapia					
Wyłącznie w leczeniu indukcyjnym/uzupełniającym	8	9	30	31	38
Wyłącznie w chorobie rozsianej	15	18	15	16	30
W leczeniu wczesnego i rozsianego raka piersi	20	22	18	19	38
Nie stosowano hormonoterapii	46	51	33	34	79
Leczenie anty-HER2					
W leczeniu uzupełniającym	1	4	0	0	1
W chorobie rozsianej	14	52	4	28	18
Nie stosowano	27	44	10	72	37
Typ pierwszego nawrotu choroby					
Miejscowy	12	13	13	13	25
Rozsiew	80	87	89	87	169
Dominująca lokalizacja przerzutów**					
Tkanki miękkie	7	8	20	20	27
Kości	19	21	38	39	57
Narządy trzewne	65	71	40	41	105

*w niektórych przypadkach nie udało się ustalić kompletnych danych klinicznych
**według kryteriów podanych na stronie 20

III.2. Przygotowanie mikromacierzy tkankowych

W pierwszym etapie zgromadzony został zatopiony w parafinowych bloczkach materiał tkankowy pochodzący z guza pierwotnego. Następnie wycinki guzów wybarwionych hematoksyliną i eozyną poddane zostały ponownej ocenie histopatologicznej, co pozwoliło na zweryfikowanie rozpoznania oraz wyznaczenie najbardziej reprezentatywnych fragmentów nowotworu, pozbawionych ognisk raka *in situ* oraz martwicy.

Wybrane preparaty wraz z odpowiadającymi im bloczkami parafinowymi, posłużyły do wyznaczenia obszarów guza z których pobrano wycinki do mikromacierzy tkankowych. Wycinki te pobierano przy użyciu igły o średnicy 1,5 mm. Bioptaty fragmentów guzów umieszczano we wcześniej przygotowanych, beztkankowych blokach parafinowych – „biorcach". Mikromacierze tkankowe wykonywano za pomocą aparatu Manual tissue arrayer I firmy Beecher Instruments (MTAI, K7 BioSystems). W obu grupach z guzów pierwotnych pobierano co najmniej dwa fragmenty (bioptaty) tkanki nowotworowej. Powstało w ten sposób siedem mikromacierzy dla guzów pierwotnych pochodzących z grupy badanej i dziesięć z grupy kontrolnej. Dodatkowo w każdym nowopowstałym bloku „biorcy" umieszczano fragmenty migdałka podniebiennego, jelita oraz nerki, które stanowiły kontrolę wewnętrzną oraz pozwalały na orientację w bloku parafinowym, zawierającym wycinki guza pochodzące od różnych chorych, a także umożliwiały szybką lokalizację wycinków.

III.3. Badania immunohistochemiczne

III.3.1. Przygotowanie preparatów

Barwienia immunohistochemiczne wykonywano na skrawkach tkankowych mikromacierzy o grubości 4 µm. Umieszczano je na szkiełkach „Superfrost PLUS" (firma Surgipath), a następnie inkubowano w temperaturze 37ºC przez noc. Zestawienie przeciwciał zastosowanych w badaniu wraz z metodyką wykonania immunohistochemicznych barwień umieszczono w tabeli 2.

Tabela 2. Badane przeciwciała oraz metody oceny immunohistochemicznej

l.p.	Przeciwciało	Producent, nr katalogowy	Stężenie	Odzyskiwanie epitopów	Czas ekspozycji	Tkanka kontrolna	Metoda oceny
1	ER	Leica,NCL-L-ER-6F11	1/400	HIER (pH6)	1,5 h	Rak piersi	Półilościowo
2	PgR	Leica,NCL-L-PGR-312	1/400	HIER (pH6)	1,5 h	Rak piersi	Półilościowo
3	HER2	Leica,NCL-L-CB11	1/50	HIER (pH9)	1,5 h	Rak piersi	Półilościowo
4	Ki67	Leica Novocastra NCL-L-Ki67-MM1	1/1.200	HIER (pH6)	1,5 h	Migdałek	Półilościowo
5	CK 5/6	Millipore, MAB1620	1/400	HIER (pH9)	1,5 h	Skóra	Jakościowo
6	CXCR4	Invitrogen, 358800	1/25.	HIER	1,5 h	Wątroba	Półilościowo
7	EGFR	Novocastra NCL-L-EGFR	1/20.	HIER (pH9)	1,5 h	Skóra, jelito, migdałek	Półilościowo
8	RAD51	Abcam ab 88572	1/25.	HIER (pH9)	1,5 h	Jądro	Półilościowo
9	E-kadheryna	Novocastra RTU-E-Cad	1/16.	HIER (pH9)	1,5 h	Skóra	Półilościowo
10	Claudyna 3	Thermo Scientific RB-9251-P1	1/100	HIER (pH6)	1,5 h	Jelito cienkie	Półilościowo
11	Claudyna 4	Thermo Scientific RB-9266-P1	1/100	HIER (pH6)	1,5 h	Prostata	Półilościowo
12	HER3	Abcam ab 20161	1/50	HIER (pH9)	Inkubacja nocna	Ślinianka	Półilościowo

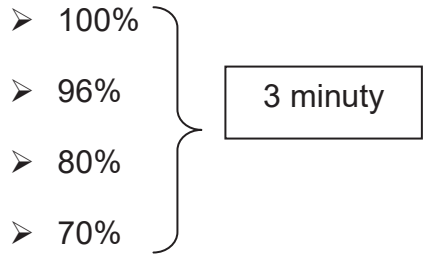
III.3.2. Barwienia immunohistochemiczne

Procedura barwień immunohistochemicznych składała się z kilku etapów.

1. Deparafinizacja w ksylenie:
   - ksylen I
   - ksylen II
   - ksylen III

   } 3 minuty

2. Rehydratacja (uwodnienie) w malejącym szeregu alkoholi



3. Płukanie preparatów w wodzie destylowanej.
4. Odzyskanie antygenowości (odsłanianie epitopów) metodą HIER (*heat induced epitope retrieval* – metoda wysokotemperaturowego odzyskiwania epitopów, 120hPa).

   Target bufor firmy DAKO o pH w zależności od przeciwciała, przy wykorzystaniu urządzenia *pressure cooker*.
5. Schłodzenie preparatów w temperaturze pokojowej przez 20-30 minut.
6. Komora wilgotna do immunohistochemii – płukanie preparatów roztworem PBS (*phosphate buffered solution*) przez 3 minuty.
7. Neutralizacja endogennej peroksydazy z zastosowaniem Peroxidase Block RE7101 przez 5 minut.
8. Dwukrotne płukanie roztworem PBS przez 3 minuty.
9. Inkubacja z Protein Block RE7102 przez 5 minut.
10. Płukanie w roztworze PBS j/w.
11. Inkubacja preparatów z przeciwciałem pierwotnym.
12. Płukanie w roztworze PBS j/w.
13. Inkubacja z Post Primary Block RE7111 przez 30 minut.
14. Płukanie roztworem PBS j/w.
15. Inkubacja z NovoLink Polimer RE7112 przez 30 minut.
16. Płukanie w roztworze PBS j/w.

17. Nakładanie roztworu DAB (3,3'diaminobenzydyna – substrat dla zobrazowania lokalizacji reakcji) – czas inkubacji 5 minut, barwa reakcji enzymatycznej – brązowa).
18. Płukanie w wodzie destylowanej.
19. Podbarwienie tkanki hematoksyliną.
20. Płukanie preparatów w wodzie bieżącej.
21. Odwodnienie preparatów w szeregu alkoholi o wzrastającym stężeniu:
    - 70%
    - 80%
    - 96%
    - 100%

    } 3 minuty
22. Prześwietlenie w ksylenie przez 3 minuty.
23. Zamykanie preparatów (balsam kanadyjski).

Dla każdej badanej grupy preparatów prowadzona była równocześnie kontrola dodatnia i ujemna.

III.3.3. Ocena odczynów immunohistochemicznych

Do badań immunohistochemicznych użyto dwunastu przeciwciał: ER, PR, HER2, Ki67, CK5/6, CXCR4, EGFR, RAD51, E-kadheryna, klaudyna 3, klaudyna 4 i HER3.

1. Receptor estrogenowy i progesteronowy

Ekspresję oceniano w jądrze komórkowym [83].

Dodatni odczyn – wystąpienie odczynu jądrowego w przynajmniej 1% komórek nowotworowych, przy obecności dodatniej kontroli wewnętrznej (elementy prawidłowego nabłonka) lub zewnętrznej (fot. 1 i 2).

Ujemny odczyn – odczyn jądrowy nieobecny lub obecny w mniej niż 1% komórek nowotworowych, przy jednoczesnej dodatniej kontroli wewnętrznej lub zewnętrznej.

2. HER2

Ekspresję oceniano w błonie komórkowej inwazyjnego komponentu guza [84].

Dodatni odczyn – obecność jednolitego intensywnego całkowitego wybarwienia błonowego w ponad 30% komórek inwazyjnego guza (wartość 3); (fot. 3).

Niejednoznaczny odczyn – obecność całkowitego wybarwienia błonowego o natężeniu słabym do umiarkowanego w ponad 10% komórek naciekającego guza (wartość 2). W tej sytuacji wykonano dodatkowo badanie metodą FISH, gdzie stosunek liczby kopii genu *HER2* do liczby kopii chromosomu 17. powyżej 2,2 oznaczał amplifikację genu *HER2*.

Ujemny odczyn – nieobecność wybarwienia lub niepełny, ledwie wykrywalny odczyn błonowy w mniej niż 10% komórek nowotworowych (wartość 0) lub słabe i niecałkowite wybarwienie błonowe w ponad 10% komórek (wartość 1+).

3. Ki 67

Ekspresję oceniano w jądrach komórkowych, zliczając odsetek wybarwionych komórek [85].

Niski indeks proliferacyjny – mniej niż 14% wybarwionych komórek.

Wysoki indeks proliferacyjny – co najmniej 14% wybarwionych komórek (fot. 4).

4. CK5/6

Ekspresję oceniano w cytoplazmie i/lub błonie komórkowej [86].

Dodatni odczyn – jakikolwiek odczyn cytoplazmatyczny i/lub błonowy w komórkach nowotworowych (fot. 5).

Ujemny odczyn – nieobecność odczynu cytoplazmatycznego i/lub błonowego.

5. CXCR4

Analizę ekspresji przeprowadzono zarówno dla jądra, jak i dla cytoplazmy i opierała się ona na ocenie odsetka wybarwionych komórek [87].

0 – nieobecność ekspresji (<1% wybarwionych komórek).

1 – niskie nasilenie ekspresji (1%-10% wybarwionych komórek).

2 – pośrednie nasilenie ekspresji (11%-50% wybarwionych komórek).

3 – wysokie nasilenie ekspresji (>50% wybarwionych komórek).

W końcowej analizie dokonano podziału na dwie kategorie:

1 – niskie nasilenie ekspresji (0 lub 1).

2 – wysokie nasilenie ekspresji (2 lub 3) (fot. 6).

6. EGFR

Ekspresję oceniano w błonie komórkowej [88].

Dodatni odczyn – odczyn błonowy w co najmniej 10% komórek nowotworu (fot. 7).

Ujemny odczyn – odczyn błonowy w mniej niż 10% komórek nowotworu lub brak odczynu.

7. RAD51

Oddzielnej ocenie poddano odczyn jądrowy i cytoplazmatyczny [76, 77].

Odczyn jądrowy – oceniano wyłącznie odsetek wybarwionych jąder, niezależnie od intensywności wybarwienia.

Ujemny odczyn jądrowy – mniej niż 10% wybarwionych jąder.

Dodatni odczyn jądrowy – co najmniej 10% wybarwionych jąder (fot. 8).

Odczyn cytoplazmatyczny – oceniano wyłącznie stopień intensywności wybarwienia cytoplazmy, ponieważ odsetek wybarwionych komórek był w obu grupach bliski 100%:

1 – niski;

2 – pośredni;

3 – wysoki.

W końcowej analizie, z uwagi na bardzo małą liczebność podgrupy z wysoką ekspresją w cytoplazmie, dokonano podziału na dwie kategorie intensywności jej wybarwienia:

1 – niski

2 – wysoki (2 lub 3) (fot. 8).

8. E-kadheryna

Ekspresję oceniano w błonie komórkowej [89].

Ujemny odczyn – brak odczynu, odczyn w mniej niż 10% komórek nowotworowych lub słaby częściowy odczyn błonowy.

Dodatni odczyn – całkowity odczyn błonowy w co najmniej 10% komórek guza (fot. 9).

9. Klaudyna 3

Ekspresję oceniano w błonie komórkowej. Przyjęto dwustopniową skalę, oceniając odczyn jako niski lub wysoki. Podziału dokonywano na podstawie wyliczonego indeksu, w skali od 0 do 300. Stanowił on iloczyn intensywności wybarwienia (skala od 0 do 3) oraz odsetka wybarwionych komórek nowotworowych (od 0 do 100%) [90].

Niskie nasilenie ekspresji: indeks <40;

Wysoki poziom ekspresji: indeks ≥40 (fot. 10).

10. Klaudyna 4

Ekspresję oceniano w błonie komórkowej. Przyjęto dwustopniową skalę oceny. Odczyn był oceniany jako niski lub wysoki. Podziału dokonywano na podstawie wyliczonego indeksu, w skali od 0 do 300. Stanowił on iloczyn intensywności wybarwienia (skala od 0 do 3) oraz odsetka wybarwionych komórek nowotworowych (od 0 do 100%) [90].

Niskie nasilenie ekspresji: indeks <20;

Wysokie nasilenie ekspresji: indeks ≥20 (fot. 11).

Ponieważ w niemal całym ocenianym materiale odsetek wybarwionych komórek był jednolity i bardzo wysoki, w analizie końcowej uwzględniono wyłącznie intensywność wybarwienia, którą oceniano w skali od 0 do 3, gdzie 0 oznaczało brak wybarwienia, 1 – słaby odczyn, 2 – pośredni odczyn i 3 – intensywny odczyn.

11. HER3

Ekspresję oceniano w cytoplazmie oraz błonie komórkowej [41]

0 – brak ekspresji;

1 – niskie natężenie ekspresji - mniej niż 20% wybarwionych komórek;

2 – wysokie natężenie ekspresji – co najmniej 20% wybarwionych komórek (fot. 12).

Podział na podtypy molekularne

Na podstawie badanych markerów, zgodnie z zaleceniami konferencji St Gallen z 2011 r. [53], dokonano podziału na poszczególne podtypy molekularne raka piersi:

Luminalny A: ER i/lub PR (+), HER2 (-), Ki67 <14%

Luminalny B1 HER2(-): ER i/lub PR(+),Ki67 ≥14%

Luminalny B2 HER2(+): ER i/lub PR(+),każde Ki67

HER2(+) nieluminalny: HER2(+), ER(-) i PR(-)

Potrójnie ujemny (TN) – ER(-), PR(-) i HER2(-).

Z grupy TN wyodrębniono podtypy:

- bazalny ER(-), PR(-), HER2(-), CK5/6(+) i/lub EGFR(+)
- *claudin low*, ER(-), PR(-), HER2(-), CK5/6(+) i/lub EGFR(+) i niskie nasilenie lub brak ekspresji E-kadheryny i niskie natężenie klaudyny 3 i 4.

III.4. Analiza statystyczna

Do oceny cech demograficznych oraz klinicznych wykorzystano statystykę opisową. W porównaniach pomiędzy grupą chorych z przerzutami do mózgu z grupą kontrolną stosowano test chi-kwadrat. W celu określenia czynników ryzyka związanych z wystąpieniem przerzutów do mózgu, poszczególne cechy poddano analizie jedno- i wieloczynnikowej. Czas przeżycia chorych przedstawiano za pomocą krzywych Kaplana-Meiera i porównywano w poszczególnych grupach za pomocą testu log-rank. Współczynniki względnego ryzyka zdarzenia (HR; ang. *hazard ratio*) obliczano na podstawie modelu Coxa (analiza jedno- i wieloczynnikowa). W modelu wieloczynnikowym zastosowano wsteczną eliminację zmiennych za pomocą testu *log-likelihood ratio*.

IV. Wyniki

IV.1. Ocena danych klinicznych

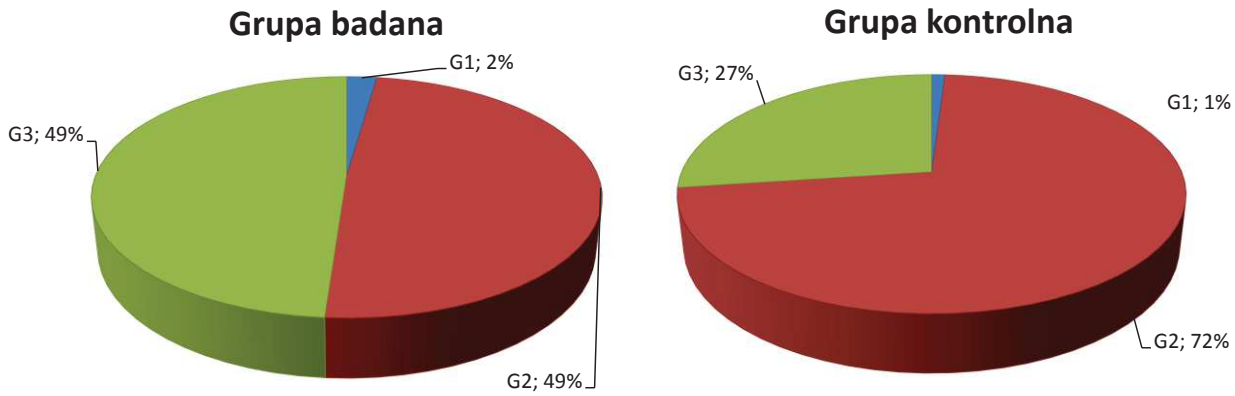
Zbiorczą charakterystykę kliniczną chorych w obu grupach przedstawiono w tabeli 1.

Średni wiek chorych w momencie rozpoznania raka piersi wyniósł w grupie badanej 52 lata (zakres 24-72 lata), a w grupie kontrolnej 60 lat (zakres 32–87). W grupie badanej było więcej chorych przed menopauzą w porównaniu do grupy kontrolnej (52% vs 32%, p=0,005).

W grupie badanej średni czas od rozpoznania choroby do wystąpienia przerzutów do mózgu wyniósł 41 miesięcy. U 57 chorych (59%) przerzuty do mózgu rozwinęły się w ciągu 3 lat od rozpoznania, a u 39 chorych (41%) – w dłuższym okresie. Średni czas przeżycia od momentu rozpoznania przerzutów do mózgu do zgonu wyniósł 6,8 miesięcy (zakres 0,3-40,2 miesięcy).

Najczęściej rozpoznawanym typem raka piersi w obu grupach był rak przewodowy (76% w grupie badanej i 86% w kontrolnej). W grupie kontrolnej rzadziej w porównaniu do grupy badanej występował rak zrazikowy (odpowiednio 8% i 18%, p=0,011). W grupie badanej znamiennie częściej występował rak piersi o najwyższym (G3) stopniu złośliwości histologicznej (odpowiednio 49% i 27%), p=0,017 (Ryc. 1).

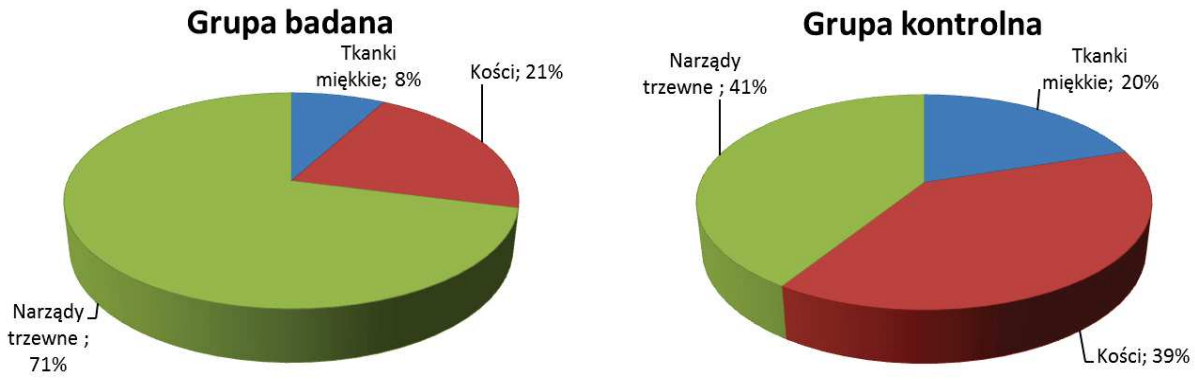
Ryc. 1. Stopnie złośliwości histologicznej w grupie badanej i kontrolnej.



Rozkład poszczególnych stopni zaawansowania klinicznego w momencie rozpoznania był w obu grupach podobny (p=0,972).

U chorych w grupie badanej znamiennie częściej w porównaniu do grupy kontrolnej dominującą lokalizację rozsiewu stanowiły narządy trzewne, natomiast rzadziej kości i tkanki miękkie (p<0,001, ryc. 2).

Ryc. 2 Lokalizacja przerzutów w grupie badanej i kontrolnej*



*według kryteriów podanych na stronie 20

IV.2. Porównanie częstości ekspresji poszczególnych białek w obu grupach

Analiza jednoczynnikowa (tabela 3)

Receptor estrogenowy (ER)

W grupie badanej ekspresję ER stwierdzono znamiennie rzadziej (n=39, 41%), w porównaniu do grupy kontrolnej (n=69, 69%); (p<0,001).

Receptor progesteronowy (PR)

Ekspresja PR występowała dwukrotnie częściej w grupie kontrolnej (n=60, 60%) w porównaniu do grupy badanej (n= 31, 33%). Różnica ta była znamienna (p<0,001).

HER2

Nadekspresja HER2 występowała prawie dwukrotnie częściej u chorych w grupie badanej w porównaniu do kontrolnej: 27 (30%) vs 14 (14%). Różnica ta była znamienna (p=0,011).

Ki67

Wysoki indeks proliferacyjny (Ki67 ≥14) występował znamiennie częściej w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej; odpowiednio u 52 (61%) i 29 (32%) chorych (p<0,001).

CK5/6

Ekspresję CK5/6 stwierdzono u 27 chorych (31%) w grupie badanej i u 21 (21%) w grupie kontrolnej. Różnica pomiędzy grupami nie była znamienna statystycznie (p=0,129)

Receptor CXCR4

Nie stwierdzono istotnych różnic w jądrowej ekspresji receptora CXCR4 pomiędzy podgrupami Nasilona ekspresja wystąpiła u 52% w grupie badanej i u 57% w grupie kontrolnej (p=0,308).

Nasilona ekspresja CXCR4 w cytoplazmie występowała znamiennie częściej u chorych w grupie badanej niż w grupie kontrolnej, odpowiednio u 80 (95%) i 76 (78%) chorych (p=0,001).

EGFR

Dodatni odczyn dla EGFR stwierdzono znamiennie częściej u chorych z grupy badanej (n=59, 69%) w porównaniu do grupy kontrolnej (n=46, 52%); (p=0,022).

RAD51

Ekspresja jądrowa RAD51 nie różniła się istotnie pomiędzy grupami (17% w grupie badanej i 11% w grupie kontrolnej; p=0,288). Nasilona ekspresja w cytoplazmie występowała znamiennie częściej u chorych z grupy badanej 57 (70%) w porównaniu do grupy kontrolnej - 32 (40%; p<0,001).

E-kadheryna

Dodatni odczyn dla E-kadheryny stwierdzono u 85 (91%) chorych z grupy badanej i 94 (94%) z kontrolnej. Różnica ta nie była znamienna (p=0,486).

Klaudyna 3

Nie odnotowano różnic w nasileniu ekspresji klaudyny 3. Niskie nasilenie ekspresji stwierdzono u 12 chorych (13%) z grupy badanej i u 9 (9%) z grupy kontrolnej, a wysokie - odpowiednio u 78 (87%) i 88 chorych (91%); (p=0,380).

Klaudyna 4

Nasilenie ekspresji klaudyny 4 było podobne w obu grupach. Słaby odczyn zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej stwierdzono u 3 chorych (3%), pośredni u 17 w obu grupach (18% i 17%), a wysoki odpowiednio w 72 (78%) i 78 (80%) przypadkach.

HER3

Ekspresja HER3 nie różniła się istotnie pomiędzy grupami. Wysoką ekspresję zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej stwierdzono u 87 chorych, co stanowiło odpowiednio 93% i 90%, (p=0,487).

Tabela 3. Porównanie ekspresji poszczególnych markerów pomiędzy grupą badaną i kontrolną (analiza jednoczynnikowa).

Marker	Ekspresja	Grupa badana n (%)	Grupa kontrolna n (%)	Wartość p
ER	(+)	39 (41)	69 (69)	p<0,001
PR	(+)	31 (33)	60 (60)	p<0,001
HER2	(+)	27 (30)	14 (14)	p=0,011
Ki67	<14%	33 (39)	61 (68)	p<0,001
CK5/6	(+)	27 (31)	21 (21)	p=0,129
CXCR4 – odczyn cytoplazmatyczny	Nasilona ekspresja	80 (95)	76 (78)	p=0,001
CXCR4 – odczyn jądrowy	0	30 (36)	28 (28)	p=0,308
	1	10 (12)	13 (13)	
	2	3 (3)	10 (10)	
	3	41 (49)	46 (47)	
EGFR	(+)	59 (69)	46 (52)	p=0,022
RAD51 – odczyn jądrowy	(+)	14 (17)	9 (11)	p=0,288
RAD51 – odczyn cytoplazmatyczny	(+)	57 (70%)	31 (40%)	p<0,001
E-kadheryna	Nasilona ekspresja	85 (91)	94 (94)	p=0,486
Klaudyna 3	Nasilona ekspresja	78 (87)	88 (91)	p=0,380
Klaudyna 4	0	0	0	p=0,975
	1	3 (3)	3 (3)	
	2	17 (19)	17 (17)	
	3	72 (78)	78 (80)	

HER3	0	0	0	p=0,487
	1	7 (7)	10 (10)	
	2	87 (93)	87 (90)	

Analiza wieloczynnikowa

W analizie wieloczynnikowej uwzględniono białka, których ekspresja w analizie jednoczynnikowej była znamiennie związana z ryzykiem rozsiewu do mózgu ($p<0,05$), to jest ER, PR, HER2, Ki67, CXCR4 odczyn cytoplazmatyczny, EGFR, RAD51 odczyn cytoplazmatyczny.

W analizie wieloczynnikowej uwzględniającej częstość występowania poszczególnych białek w obu grupach, niezależnymi czynnikami ryzyka wystąpienia przerzutów do mózgu okazały się marker proliferacji Ki67 ≥14 ($p=0,001$; CI 95% [0,51-1,91]) oraz cytoplazmatyczna ekspresja białka RAD51 ($p=0,001$; CI 95% [0,44-1,84]).

IV.3. Ocena względnego ryzyka przerzutów do mózgu w zależności od ekspresji badanych białek

W dodatkowej analizie ekspresji poszczególnych białek w guzie pierwotnym, przy użyciu metody Coxa oceniono względne ryzyko rozwoju przerzutów do mózgu u chorych na rozsianego raka piersi.

Analiza jednoczynnikowa

Wyniki analizy jednoczynnikowej przedstawiono w tabeli 4. Nieobecność ekspresji ER lub PR zwiększała względne ryzyko rozwoju przerzutów do mózgu. Ryzyko to było także znamiennie większe u chorych, u których w guzie pierwotnym obecna była nasilona ekspresja HER2, CK5/6, EGFR, RAD51 (zarówno w jądrze jak i cytoplazmie), CXCR4 (w cytoplazmie) lub wysoki wskaźnik proliferacji (Ki67 ≥14%). Ekspresja pozostałych białek, w tym CXCR4 w jądrze, E-kadheryny, klaudyny 3 i 4, a także HER3 nie miała wpływu na ryzyko rozsiewu do mózgu.

Tabela 4. Względne ryzyko rozsiewu do mózgu (analiza jednoczynnikowa)

Marker	HR	Wpływ ekspresji badanych markerów na ryzyko rozwoju przerzutów do mózgu	95% CI	P
ER(-)	3,44	Wzrost	0,19-0,45	<0,001
PR(-)	2,63	Wzrost	0,25-0,59	<0,001
HER2	1,75	Wzrost	1,11-2,76	0,016
Ki67 ≥14%	2,99	Wzrost	1,92-4,67	<0,001
CK5/6	2,00	Wzrost	1,26-3,19	0,003
EGFR	2,12	Wzrost	1,33-3,37	0,002
RAD51 jądrowo	2,04	Wzrost	1,13-3,67	0,018
RAD51 cytoplazmatycznie	2,42	Wzrost	1,59-3,69	<0,001
CXCR4 cytoplazmatycznie	1,5	Wzrost	1,09-2,06	0,012
CXCR4 jądrowo	0,96	Brak zależności	0,82-1,13	0,63
Klaudyna 3	0,93	Brak zależności	0,51-1,71	0,82
Klaudyna 4	0,83	Brak zależności	0,55-1,24	0,36
E-kadheryna	1,09	Brak zależności	0,53-2,28	0,80
HER3	1,71	Brak zależności	0,78-3,74	0,18

Analiza wieloczynnikowa

W analizie wieloczynnikowej względnego ryzyka przerzutów do mózgu uwzględniono białka, których ekspresja miała związek z ryzykiem przerzutów w

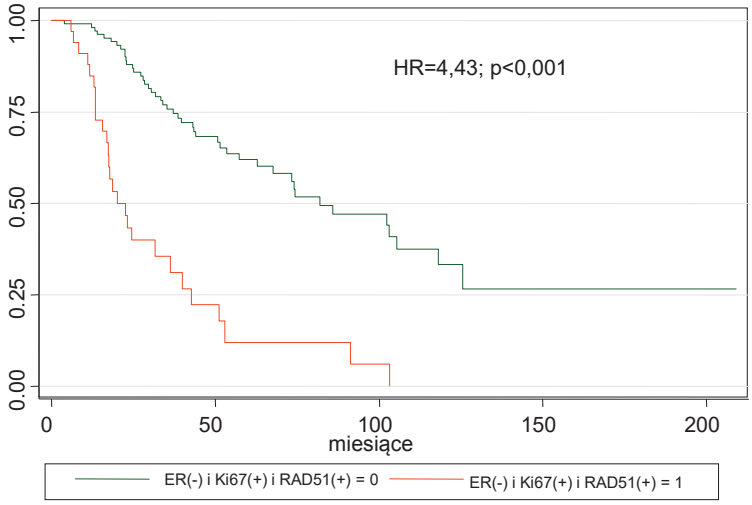
tej lokalizacji w analizie jednoczynnikowej, to jest ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki67 ≥14, RAD51 w jądrze i cytoplazmie, CXCR4 w cytoplazmie. Względne ryzyko rozwoju przerzutów do mózgu w analizie wieloczynnikowej zwiększała nasilona ekspresja RAD51 w cytoplazmie (HR 1,87; p=0,014), Ki67 ≥14% (HR 2,76; p<0,001) oraz nieobecność ekspresji ER (HR 1,72; p=0,029).

Następnie podjęto próbę stworzenia profilu molekularnego związanego z największym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu. W tym celu przeprowadzono analizę z uwzględnieniem wszystkich trzech markerów które osiągnęły znamienność statystyczną w analizie wieloczynnikowej. W ten sposób stworzono cztery profile molekularne, dla których oszacowano ryzyko rozsiewu do mózgu (tabela 5, ryciny 3-6). Profil białkowy obejmujący RAD51cyt(+), Ki67(+) oraz ER(-) blisko 4,5-krotnie zwiększał ryzyko rozsiewu do mózgu, w stosunku do pozostałych chorych na rozsianego raka piersi (HR 4,43; p<0,001). Niewiele niższe ryzyko występowało w przypadku profilów dwubiałkowych: ER(-) i Ki67(+) (HR 4,05; p<0,001) oraz Ki67(+) i RAD51cyt(+) (HR 3,88; p<0,001).

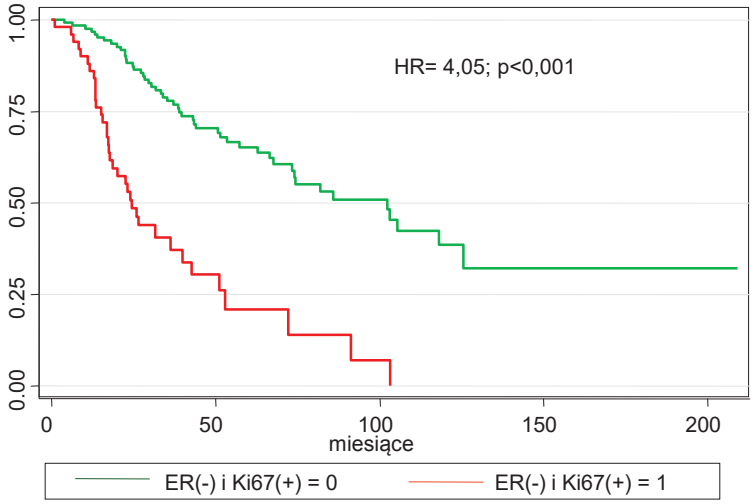
Tabela 5. Ryzyko rozsiewu do mózgu w zależności od profilu molekularnego

Profil molekularny	HR	95% CI	P
ER/Ki67/RAD51(cyt)	4,43	2,69-7,27	<0,001
ER/Ki67	4,05	2,57-6,37	<0,001
Ki67/RAD51(cyt)	3,88	2,46-6,11	<0,001
ER/RAD51(cyt)	3,02	1,91-4,78	<0,001

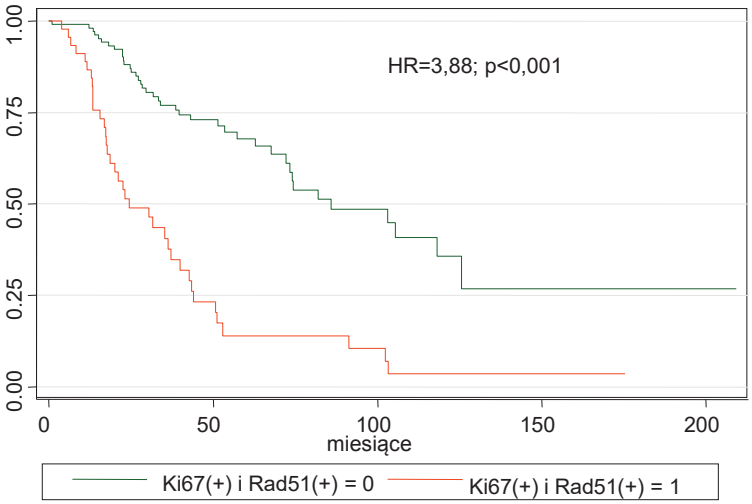
Rycina 3. Czas przeżycia chorych w zależności od obecności w guzie pierwotnym profilu ER(-)/Ki67(+)/RAD51cyt(+)



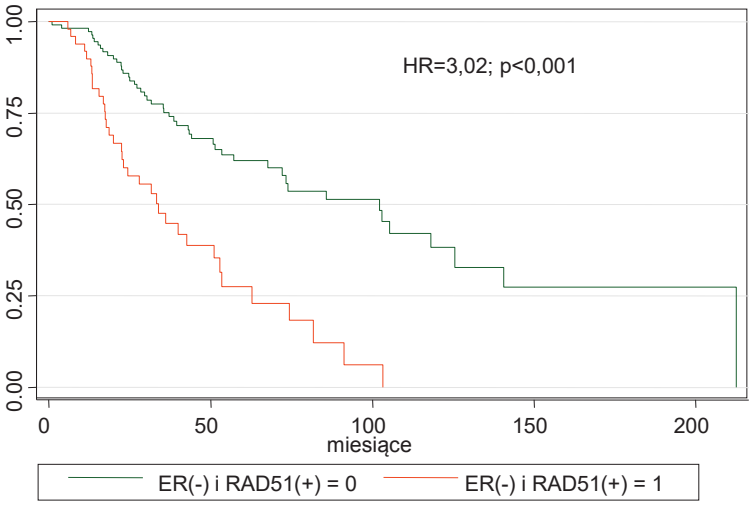
Rycina 4. Czas przeżycia chorych w zależności od obecności w guzie pierwotnym profilu ER(-)/Ki67(+)



Rycina 5. Czas przeżycia chorych w zależności od obecności w guzie pierwotnym profilu Ki67(+)/RAD51cyt(+)



Rycina 6. Czas przeżycia chorych w zależności od obecności w guzie pierwotnym profilu ER(-)/RAD51cyt(+)



Ekspresja badanych markerów w zależności od czasu wystąpienia rozsiewu do mózgu

Ekspresja EGFR wiązała się z ryzykiem szybszego, tzn. w ciągu 3 lat od rozpoznania raka piersi, wystąpienia przerzutów do mózgu (79% vs 53% u chorych bez ekspresji, p=0,011). W grupie z wczesnym rozsiewem rzadziej

w porównaniu do chorych z rozsiewem powyżej 3 lat występowała także ekspresja ER (34% vs 53%) oraz PR (25% vs 44%). Różnica dla PR była na granicy znamienności statystycznej, (p=0,057).

Analiza podtypów molekularnych

Analizę podtypów molekularnych przeprowadzono u 175 chorych u których udało się wykonać oznaczenia czterech markerów: ER, PR, HER2 i Ki67. Na podstawie zaleceń konferencji St. Gallen 2011, chore te przydzielono do poszczególnych podtypów, wyróżniając typ luminalny A, luminalny B1 (HER2-ujemny), luminalny B2 (HER2-dodatni), HER2-dodatni nieluminalny oraz potrójnie ujemny. Ponadto wśród chorych o fenotypie potrójnie ujemnym przeprowadzono ocenę w kierunku podtypu bazalnego (na podstawie ekspresji CK5/6 i/lub EGFR) i *claudin-low* (dodatkowo przy niskim nasileniu lub braku ekspresji E-kadheryny i niskim nasileniu ekspresji klaudyn).

W grupie badanej najczęściej występował podtyp potrójnie ujemny (38%), z czego aż 85% przypadków stanowił podtyp bazalny (tabela 6). W grupie tej najrzadziej występował typ luminalny A (16%). Z kolei w grupie kontrolnej najczęstszy był podtyp luminalny A (48%), a najrzadszy HER2-dodatni nieluminalny (9%) i luminalny B z nadekspresją receptora HER2 (7%) (tabela 6). Różnica w częstości występowania poszczególnych typów molekularnych pomiędzy grupą badaną i kontrolną była znamienna statystycznie (p<0,001).

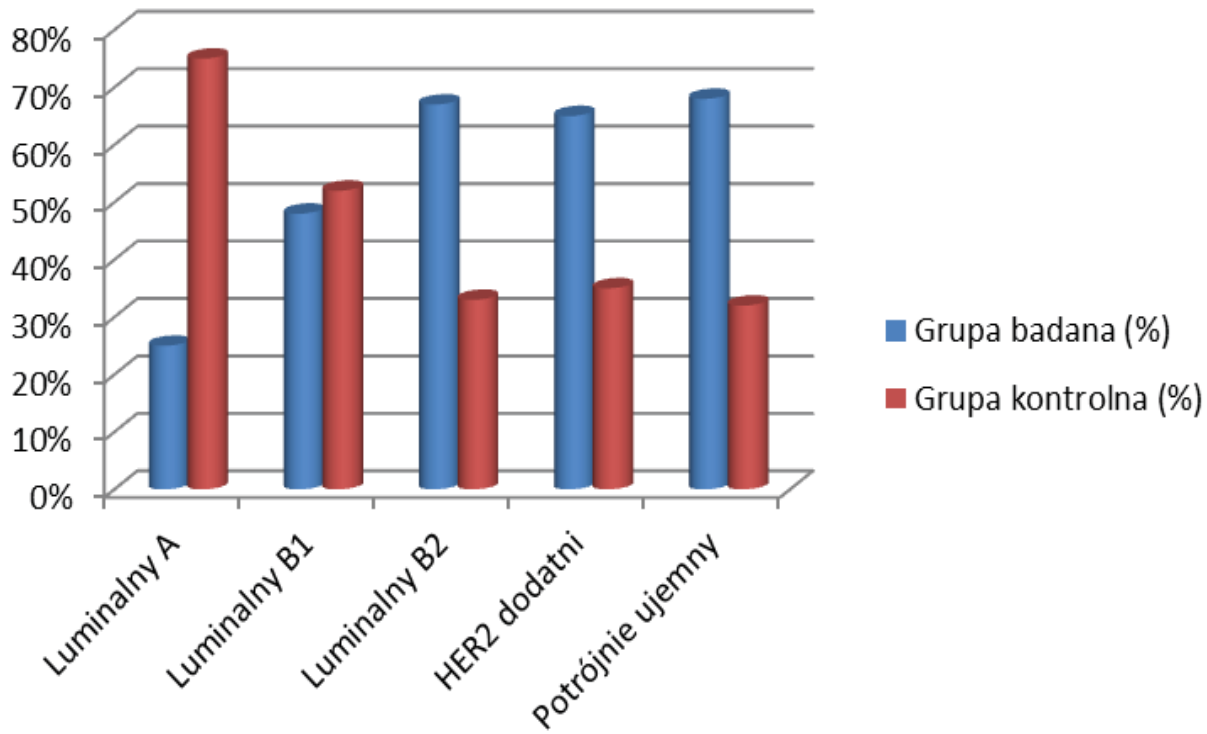
Przy przyjętym poziomie odcięcia ekspresji klaudyn i E-kadheryny, u żadnej chorej w obu grupach nie stwierdzono obecności podtypu *claudin-low*.

W podtypie luminalnym A chore z przerzutami do mózgu stanowiły 25%. Z kolei w podtypie luminalnym B2 (HER2-dodatnim), potrójnie ujemnym oraz HER2-dodatnim nieluminalnym przerzuty do mózgu stwierdzano u większości chorych. Różnice te były znamienne statystycznie (p<0,001). Udział chorych obu grup w poszczególnych typach raka piersi przedstawiono na ryc. 7.

Tabela 6. Rozkład częstości występowania poszczególnych typów raka piersi w grupie badanej i kontrolnej

Typ raka piersi	Grupa badana n (%)	Grupa kontrolna n (%)
Luminalny A	14 (16)	41 (48)
Luminalny B (całość)	26 (29)	21 (24)
Luminalny B1	14 (16)	15 (17)
Luminalny B2	12 (13)	6 (7)
HER2 dodatni	15 (17)	8 (9)
Potrójnie ujemny	34 (38)	16 (19)

Rycina 7. Udział chorych z przerzutami i bez przerzutów do mózgu w poszczególnych typach molekularnych raka piersi



Podtypy luminalne A i B1 u chorych z grupy kontrolnej występowały łącznie dwa razy częściej w porównaniu do badanej, odpowiednio u 56 (65%) i 28 (31%) chorych (p<0,001). Z kolei pozostałe podtypy (potrójnie ujemny, HER2-dodatni luminalny i nieluminalny) występowały dwa razy częściej w grupie chorych z przerzutami do mózgu: 61 (68%) vs 30 (35%; p<0,001).

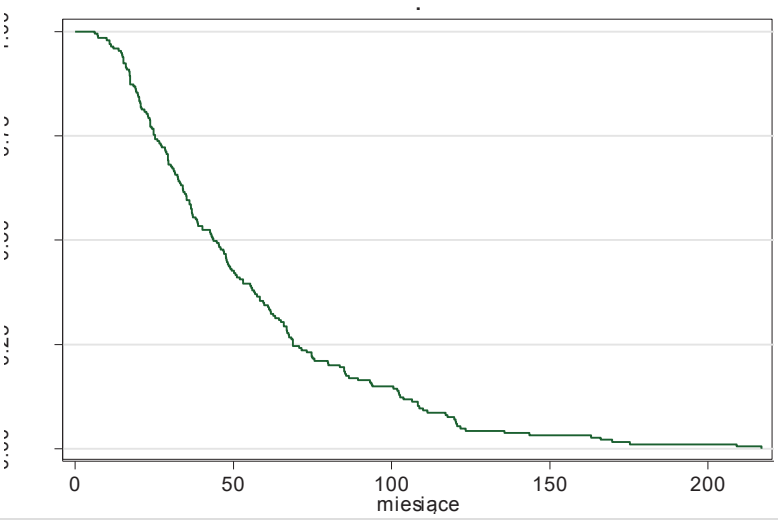
Analiza podtypów molekularnych w zależności od czasu rozsiewu do mózgu (do 3 lat lub później), wykazała że u chorych z wczesnym rozsiewem dominował podtyp potrójnie ujemny (44%), a najrzadziej występował podtyp luminalny A (13%). Różnice w częstości występowania poszczególnych podtypów raka piersi w tej analizie nie osiągnęły jednak znamienności statystycznej.

Ryzyko przerzutów do mózgu było największe dla raków potrójnie ujemnych (HR 1,21; p<0,001; 95%CI 1,11-1,32), a najmniejsze dla podtypu luminalnego A (HR 0,25; p<0,001; 95%CI 0,14-0,44). Nie stwierdzono związku pozostałych podtypów molekularnych z ryzykiem rozsiewu do mózgu.

IV.4. Analiza przeżyć

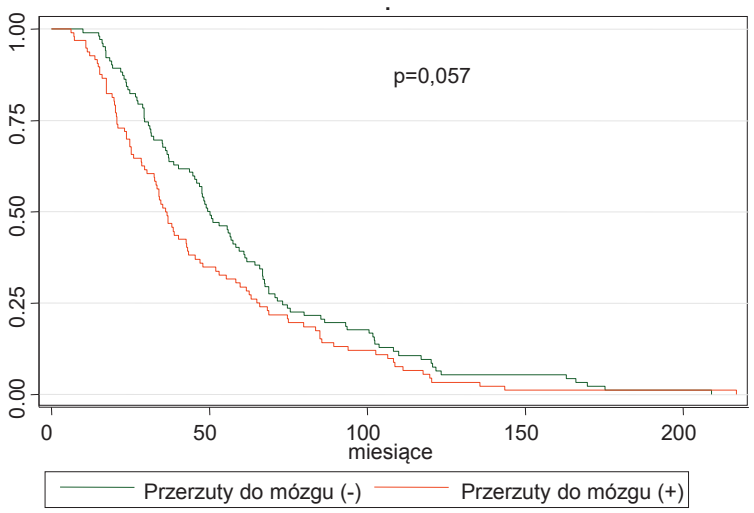
Mediana całkowitego czasu przeżycia dla wszystkich chorych wyniosła 43,7 miesięcy (rycina 8).

Rycina 8. Czas przeżycia dla wszystkich chorych



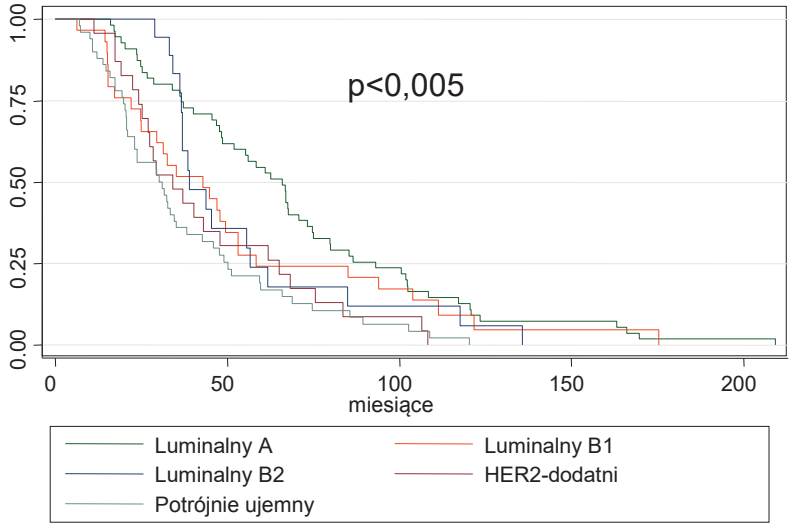
Mediana czasu całkowitego przeżycia dla chorych z przerzutami do mózgu wyniosła 36,2 miesięcy, natomiast u chorych z inną lokalizacja przerzutów – 50,2 miesięcy (test log-rank p=0,057; rycina 9).

Rycina 9. Czas przeżycia w zależności od przerzutów do mózgu



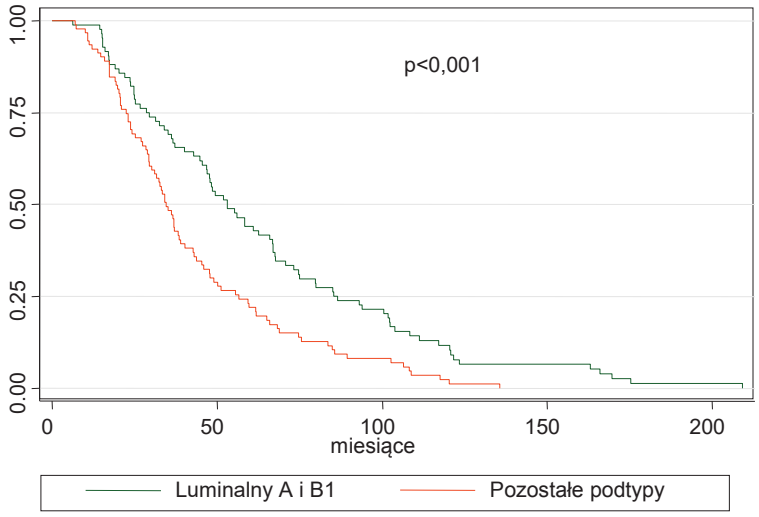
Spośród wszystkich analizowanych podtypów molekularnych, najlepsze rokowanie stwierdzono u chorych z fenotypem luminalnym A, a najgorsze – z fenotypem bazalnym. Mediana całkowitego czasu przeżycia dla obu tych podtypów wyniosła odpowiednio 65,9 i 29,3 miesięcy (rycina 10).

Rycina 10. Czas przeżycia w zależności od podtypu molekularnego



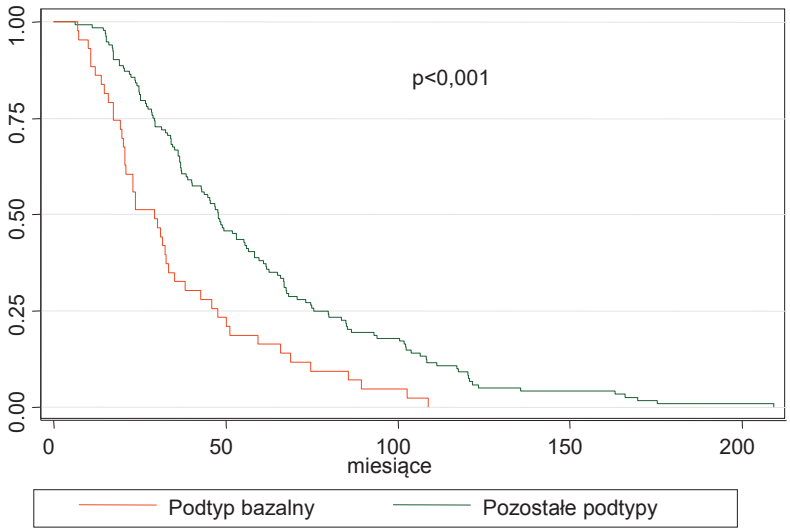
Czas całkowitego przeżycia chorych z podtypem luminalnym A oraz luminalnym B1 (HER2-ujemnym) analizowanych łącznie był znamiennie dłuższy w porównaniu do wszystkich pozostałych podtypów (53 vs 34,6 miesięcy; test log rank, p<0,001) (rycina 11).

Rycina 11. Czas przeżycia chorych z podtypem luminalnym A i B1 łącznie względem pozostałych



Najgorsze rokowanie stwierdzono u chorych z bazalnym podtypem raka piersi. Mediana czasu całkowitego przeżycia wyniosła w tej grupie 29,3 miesięcy w porównaniu do 47,8 miesięcy dla pozostałych podtypów (test log rank, p<0.001) (rycina 12).

Rycina 12. Czas przeżycia chorych z podtypem bazalnym względem pozostałych



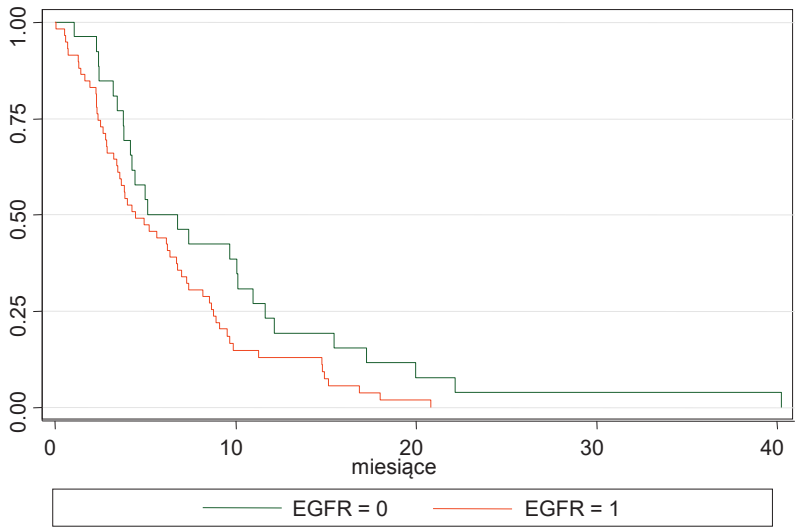
W grupie badanej średni czas przeżycia od rozsiewu do mózgu wyniósł 6,8 miesięcy (zakres od 0,03 do 40,2 miesięcy). Czas przeżycia chorych, u których stwierdzono nadekspresję EGFR oraz wysoki odczyn jądrowy lub cytoplazmatyczny dla RAD51 był krótszy w porównaniu do chorych, u których nie wystąpiła żadna z wymienionych cech. Wysoki indeks proliferacyjny Ki67 był na granicy znamienności, a pozostałe markery nie miały związku z czasem przeżycia po rozpoznaniu przerzutów do mózgu (tabela 7 i ryciny 13-16).

Tabela 7. Mediana czasu przeżycia od momentu rozpoznania przerzutów do mózgu w zależności od wybranych markerów

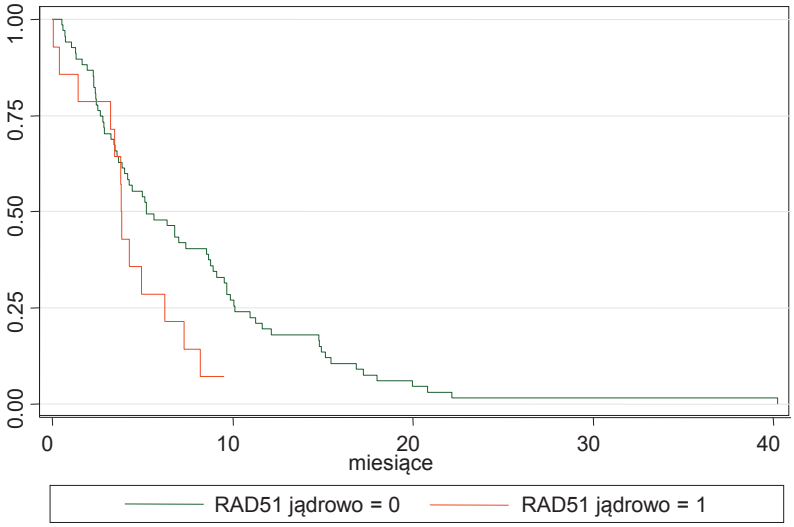
Marker	Ekspresja	Liczebność	mediana czasu przeżycia w mieś.	P
EGFR	(+)	59	4,46	p=0,042
	(-)	27	6,79	
RAD51 – odczyn jądrowy	(+)	14	3,8	p=0,043
	(-)	68	5,2	
RAD51 – odczyn cytoplazmatyczny	Wysoka ekspresja	57	4,9	p=0,035
	Niska ekspresja	25	5,6	
Ki67	≥14	52	4,2	p=0,055
	<14	33	5,6	

W analizie wieloczynnikowej niezależnymi czynnikami związanymi z czasem przeżycia od momentu rozpoznania przerzutów do mózgu okazały się EGFR (p=0,031; CI 95% [1,05-2,93]) i Ki67 (p=0,019; CI 95% [1,10-2,98]).

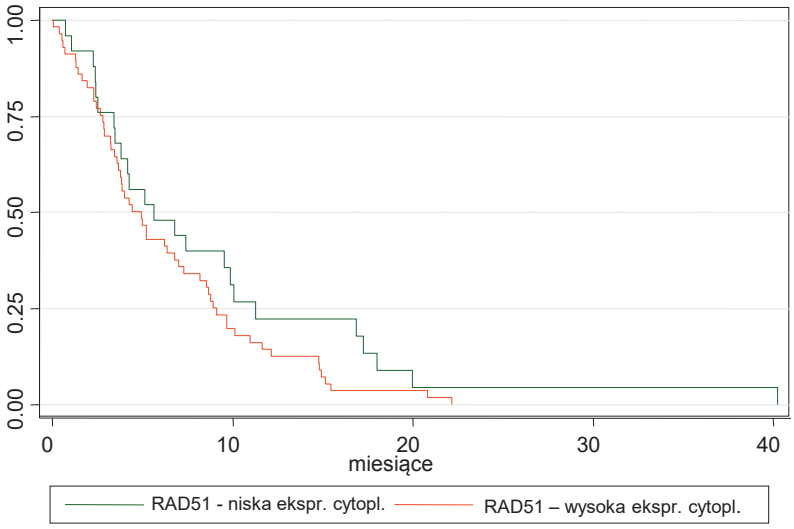
Rycina 13. Czas przeżycia chorych z przerzutami do mózgu w zależności od ekspresji EGFR



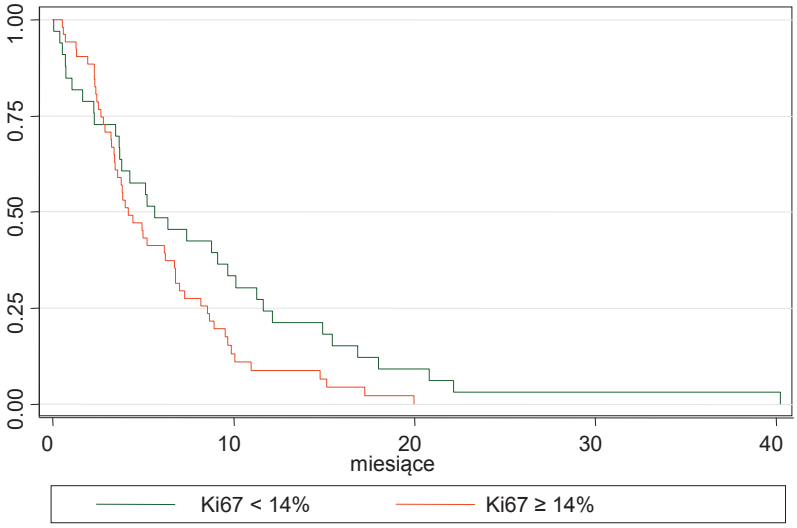
Rycina 14. Czas przeżycia chorych z przerzutami do mózgu w zależności od nasilenia ekspresji w jądrach komórkowych RAD51



Rycina 15. Czas przeżycia u chorych z przerzutami do mózgu w zależności od nasilenia ekspresji w cytoplazmie RAD51



Rycina 16. Czas przeżycia chorych z przerzutami do mózgu w zależności od indeksu proliferacyjnego Ki67



V. Dyskusja

Przerzuty do mózgu dotyczą coraz większego odsetka chorych na rozsianego raka piersi. Stanowią one czwartą co do częstości, zaraz po kościach, płucach i wątrobie, lokalizację przerzutów i w istotny sposób wpływają na umieralność chorych na raka piersi. Wciąż jednak nie zostały w pełni poznane mechanizmy ich powstawania. Mimo że poszczególne podtypy raka piersi różnią się ryzykiem przerzutów do mózgu, do tej pory nie udało się stworzyć profilu molekularnego, który umożliwiałby ocenę indywidualnego ryzyka wystąpienia rozsiewu w tej lokalizacji. W niniejszej pracy podjęto więc próbę zbadania wpływu kilkunastu wyłonionych na podstawie dostępnego piśmiennictwa markerów białkowych oraz wybranych cech klinicznych na ryzyko powstania przerzutów do mózgu.

We wcześniejszych pracach wykazano, że przerzuty do mózgu częściej występowały u młodszych chorych, które w momencie rozpoznania raka piersi były przed menopauzą (52% w porównaniu do 32% u chorych po menopauzie p=0,005) [4, 10, 70] oraz w guzach o wyższym stopniu histologicznej złośliwości (cechę G3 w guzie pierwotnym stwierdzono u 49% chorych z przerzutami do mózgu i u 28% bez przerzutów, p=0,017) [3, 10, 82]. W grupie badanej znamiennie częściej dominującą lokalizacją przerzutów były narządy trzewne: płuca i wątroba. Jest to zjawisko często opisywane wśród chorych z przerzutami do mózgu [19, 91, 92] i wiąże się z krwiopochodną drogą ich powstawania. Wydaje się też, że może to mieć związek z postulowanym przez niektórych autorów podobnym „podpisem genetycznym" guza pierwotnego w przypadku przerzutów do płuc i mózgu [48, 49]. Taki typ rozsiewu najczęściej towarzyszy nowotworom o fenotypie HER2-dodatnim oraz potrójnie ujemnym [19]. Obserwację tę potwierdzają wyniki niniejszej pracy – oba wymienione typy raka piersi dominowały w grupie z przerzutami do mózgu. Podobnie jak w innych doniesieniach, średni czas do wystąpienia przerzutów do mózgu wyniósł blisko 3,5 roku [91], a średni czas przeżycia po ich rozpoznaniu - około 7 miesięcy [93]. W obu grupach podobny był wyjściowy stopień zaawansowania (p=0,972), więc nie miał on wpływu na wyniki analizy immunohistochemicznej. Co ciekawe, w grupie badanej

dwukrotnie więcej chorych otrzymało indukcyjną chemioterapię, w tym z udziałem taksoidów (23% vs 3%). Najpewniej było to wynikiem wysokiego udziału w tej grupie chorych na potrójnie ujemnego raka piersi, który charakteryzuje się szybkim wzrostem i często jest rozpoznawany w stadium miejscowego zaawansowania. W niektórych doniesieniach taksoidy, zwłaszcza stosowane w okresie rozsiewu nowotworu wymieniane były wśród czynników mogących mieć związek ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu [9]. Kolejne analizy, w tym dotyczące stosowania paklitakselu w uzupełniającej chemioterapii, nie potwierdziły jednak tego związku [94]. Różnice w systemowym leczeniu pomiędzy obiema grupami dotyczyły także trastuzumabu. W grupie badanej u chorych na HER2-dodatniego raka był on dwukrotnie częściej stosowany (56% vs 28%) w porównaniu do grupy kontrolnej. W wielu badaniach z udziałem chorych z nadekspresją HER2, obserwowano zwiększoną częstość przerzutów do mózgu w grupach leczonych trastuzumabem (24–40%) [3, 4, 10, 12]. Początkowo podejrzewano, że może to być wynikiem działania samego trastuzumabu lub oporności na leczenie związanej ze zmianą fenotypu nowotworu w przerzutowym ognisku. Dalsze obserwacje nie potwierdziły jednak tego zjawiska [13, 95]. Wydaje się, że wysoki udział chorych z przerzutami do mózgu w tej grupie może być związany z wydłużeniem czasu całkowitego przeżycia, wynikającym z lepszej kontroli pozaczaszkowych ognisk choroby pod wpływem leczenia trastuzumabem oraz nieprzenikaniem tego przeciwciała przez barierę krew-mózg. W efekcie dłuższy jest czas w którym mogą się rozwinąć przerzuty w tej lokalizacji, stanowiącej chroniony obszar (ang. *sanctuary site*) [14]. Dodatkowo w retrospektywnych badaniach zaobserwowano, że u chorych które otrzymywały wcześniej trastuzumab, do rozsiewu do mózgu dochodziło później, niż u chorych z HER2-dodatnim nowotworem, u których nie stosowano tego przeciwciała. Z kolei kontynuowanie leczenia trastuzumabem, pomimo progresji w mózgu, wydłużało czas przeżycia w porównaniu do chorych, u których zaprzestano stosowania tego leku [26]. W niniejszej pracy podgrupa, która otrzymywała trastuzumab była na tyle mała, że nie wykazano takich zależności.

Nieobecność ekspresji ER i PR stwierdzono blisko dwukrotnie częściej u chorych z przerzutami do mózgu (odpowiednio 59% i 67%) niż z inną lokalizacją przerzutów (31% i 40%). Różnica ta była znamienna w analizie jednoczynnikowej ($p<0,001$). Jest to zgodne z wynikami dostępnych badań, gdzie wśród chorych z przerzutami do mózgu dominują guzy hormonoujemne. W piśmiennictwie udział chorych u których nie występowała ekspresja ER i PR w guzie pierwotnym zawarty był w granicach odpowiednio od 48 do 87% i od 59 do 92% [96-100]. Nowotwory o takim fenotypie zwykle charakteryzuje bardziej agresywny przebieg kliniczny i gorsze rokowanie. Nadal jednak nie wiadomo, czy zwiększone ryzyko przerzutów do mózgu towarzyszące hormonoopornym guzom jest wynikiem ich „zaprogramowanego" przebiegu, czy też udziałem w niej niekorzystnie rokujących podtypów molekularnych, np. bazalnego lub *claudin-low* [101].

W niniejszej pracy nadmierna ekspresja lub amplifikacja genu *HER2* były częstsze u chorych z grupy badanej, co potwierdza związek tej cechy ze zwiększonym ryzykiem rozsiewu do mózgu. Obecność cechy HER2 stwierdzono u 30% chorych, w porównaniu do 14% w grupie kontrolnej ($p=0,011$). W ogólnej populacji chorych na raka piersi częstość występowania nadmiernej ekspresji lub amplifikacji genu *HER2* szacowana jest na około 20%, przy czym u chorych z przerzutami do mózgu odsetek ten jest znamiennie wyższy i wynosi od 30 do ponad 40% [36-38, 93, 99]. W większości badań cecha ta wiązała się ze znamiennie wyższym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu, szacowanym na 20-40%, w porównaniu do 10–16% w populacji chorych na rozsianego HER2-ujemnego raka piersi [36-39]. Wśród wielu możliwych przyczyn tego zjawiska bierze się pod uwagę większą zdolność komórek HER2-dodatniego raka piersi do migracji w kierunku OUN [48].

W niniejszej pracy oceniono również dwa inne białka należące do rodziny receptorów dla naskórkowego czynnika wzrostu: EGFR i HER3, których heterodimeryzacja z HER2 aktywuje szlak sygnałowy tego receptora. Ekspresja EGFR w większości doniesień wiązała sie z gorszym rokowaniem, wyższym stopniem zaawansowania oraz brakiem ekspresji receptorów hormonalnych [102-104]. Jest on również jednym z markerów bazalnego podtypu raka piersi.

Ekspresja EGFR częściej występowała u chorych z przerzutami do mózgu w porównaniu do chorych bez zajęcia tego narządu [102, 105]. Podawana w piśmiennictwie częstość jego ekspresji w guzie pierwotnym u chorych z przerzutami do mózgu wahała się w szerokich granicach od 14 do 45% [99, 102, 105, 106]. W badanym materiale ekspresja EGFR występowała znamiennie częściej u chorych z grupy badanej w porównaniu do kontrolnej (odpowiednio 69% i 52%). Biorąc pod uwagę, że udział odczynów dodatnich w całej populacji chorych na raka piersi szacuje się na 15–20%, w obu grupach zjawisko to występowało znacznie częściej. Tak duże różnice mogą być związane z przyjętą metodą oceny odczynu immunohistochemicznego w poszczególnych pracach, uwzględniającego wyłącznie odczyn błonowy lub dodatkowo cytoplazmatyczny, bądź wysokością punktu odcięcia która w różnych doniesieniach wahała się od 1 do 30% [71, 88, 102, 107-109]. Niezależnie od tego zgodnie z przyjętym założeniem badawczym, przedmiotem niniejszego badania były wyłącznie chore z rozsiewem nowotworu, wśród których cecha ta była najpewniej nadreprezentowana w stosunku do całej populacji chorych na raka piersi. W niniejszej pracy ekspresja EGFR wiązała się dodatkowo z ryzykiem wczesnego rozsiewu do mózgu oraz krótszego czasu przeżycia po rozpoznaniu przerzutów w tej lokalizacji, co również potwierdza jej niekorzystne znaczenie rokownicze.

Kolejnym ocenianym białkiem z rodziny HER było HER3. Podobnie jak w odniesieniu do EGFR, również udział guzów wykazujących ekspresję HER3 wahał się w poszczególnych badaniach w szerokich granicach od 10 do 75% [41, 106, 109], a zjawisko to było związane z gorszym rokowaniem [41]. Udział guzów HER3-dodatnich w badanym materiale był również wyższy niż we wcześniejszych doniesieniach i nie różnił się miedzy grupą badaną oraz kontrolną (odpowiednio 93 i 90%). Podobnie jak w odniesieniu do EGFR, tak duża rozpiętość wyników, oprócz doboru chorych, mogła być spowodowana różnorodnością stosowanych przeciwciał lub brakiem powtarzalności procedur związanych z barwieniem. Jednym z takich czynników może być na przykład różny czas inkubacji z przeciwciałem (w niniejszej pracy z uwagi na techniczne trudności z uzyskaniem prawidłowych barwień dla HER3, posłużono się nocną inkubacją). Nie bez znaczenia pozostaje także korzystanie z archiwalnego

materiału i związany z tym potencjalny wpływ upływu czasu na jakość przechowywanych tkanek i w efekcie na wynik barwień. Podstawowym utrudnieniem w analizie porównawczej uzyskanych wyników pozostaje jednak przyjmowanie różnych punktów odcięcia i metod interpretacji odczynu immunohistochemicznego. Największa zgodność z wynikami dostępnymi w piśmiennictwie dotyczyła ekspresji HER2, co może wynikać z powszechnej dostępności tego testu w diagnostyce onkologicznej i wystandaryzowania metod oceny jego ekspresji.

Kolejnym białkiem, które związane było z ryzykiem przerzutów do mózgu, był marker proliferacji Ki67. Zgodnie z zaleceniami konferencji St Gallen 2011, za punkt odcięcia dla zróżnicowania guzów o wysokim i niskim potencjale proliferacyjnym przyjęto wartość 14%. Ekspresja Ki67 była przedmiotem wielu badań oceniających jej przydatność rokowniczą i predykcyjną [110]. W większości przypadków wykazano wysoką zgodność pomiędzy wysoką ekspresją Ki67 a stopniem histologicznej złośliwości [111] i krótszym czasem całkowitego przeżycia [110, 112, 113]. W pracach tych przyjmowano wartości odcięcia w zakresie od 5 do 30%. Cheang i wsp. [85], na podstawie ekspresji ER, PR, HER2 i Ki67 dokonali podziału typu luminalnego na podtyp A i B, przyjmując punkt odcięcia dla Ki67 na poziomie 14%. Chore z Ki67 o wartości ≥14% miały gorsze rokowanie i związane z tym większe ryzyko nawrotu i zgonu z powodu raka piersi w porównaniu do chorych z niższymi wartościami tego markera. W omawianym materiale wartości Ki67 ≥14% znamiennie częściej występowały u chorych z przerzutami do mózgu w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio w 61% i 32% przypadków). Różnica ta była znamienna zarówno w analizie jedno- jak i wieloczynnikowej (p=0,001). Dodatkowo u chorych z wysokim wskaźnikiem Ki67 w guzie pierwotnym, czas przeżycia po rozpoznaniu przerzutów do mózgu był krótszy w porównaniu do grupy z niskim Ki67.

Kolejnym receptorem, którego silna ekspresja w cytoplazmie wiązała się z przerzutami do mózgu był CXCR4. W grupie z przerzutami i bez przerzutów do mózgu stwierdzono wysoki odczyn cytoplazmatyczny odpowiednio u 95% i 78% chorych (p=0,001), podczas gdy odczyn jądrowy dla tego markera

nie różnił się pomiędzy grupami. Dotychczas opublikowane wyniki dotyczące ekspresji CXCR4 nie są jednoznaczne. Woo i wsp. [87] stwierdzili jego zwiększoną ekspresję w jądrze u 60% chorych, natomiast ekspresję cytoplazmatyczną tylko u 31%. Wysoka ekspresja jądrowa wiązała się z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Podobnie Su i wsp. [114] opisali częstsze występowanie silnej ekspresji jądrowej (69%), podczas gdy wysoki odczyn cytoplazmatyczny dotyczył tylko 12% chorych, ale wiązał się z zajęciem przerzutami pachowych węzłów chłonnych. W kolejnym badaniu, przeprowadzonym przez Salvucci i wsp. [115], obejmującym 1808 przypadków inwazyjnego raka piersi, stwierdzono częste współwystępowanie ekspresji CXCR4 zarówno w jądrze, jak i w cytoplazmie. Silna ekspresja cytoplazmatyczna wiązała się z przerzutami do węzłów chłonnych, wyższym stopniem złośliwości histologicznej oraz nadmierną ekspresją HER2, a także brakiem ekspresji ER i PR. Li i wsp. [116] stwierdzili również współwystępowanie ekspresji CXCR4 w cytoplazmie z nadmierną ekspresją HER2 sugerując, że może ona wpływać na wzrost ekspresji CXCR4 oraz hamować jego degradację indukowaną ligandem. Uważa się, że receptor ten odgrywa ważną rolę w procesie powstawania przerzutów do płuc w HER2-dodatnim raku piersi [116]. Wydaje się więc, że lokalizacja odczynu immunohistochemicznego (w jądrze lub cytoplazmie) może mieć różne biologiczne znaczenie i w odmienny sposób wpływać na przebieg choroby. W przedstawionym materiale wysoka ekspresja cytoplazmatyczna wiązała się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu, podczas gdy lokalizacja jądrowa nie różniła się pomiędzy grupą badana i kontrolną.

Kolejnym białkiem, które poddano immunohistochemicznej ocenie był RAD51. Zaburzeniom ekspresji RAD51 w raku piersi przypisuje się niekorzystny wpływ na rokowanie u chorych na raka piersi oraz współwystępowanie z mutacją w genie *BRCA2* [76, 77]. Związek zaburzeń *RAD51* ze zwiększonym ryzykiem rozsiewu do mózgu po raz pierwszy opisali Duchnowska i wsp. [50], dokonując analizy ekspresji genów na poziomie RNA u chorych na rozsianego raka piersi z nadekspresją lub amplifikacją genu *HER2*. Autorzy ci wyodrębnili 13 genów, w tym *RAD51*, których ekspresja związana była z wysokim ryzykiem wystąpienia wczesnych przerzutów

do mózgu. Wyniki te przeszły pomyślnie walidację przy zastosowaniu metody RT-PCR na niezależnej grupie HER2-dodatnich chorych [51]. Niniejsza praca stanowi natomiast pierwszą w piśmiennictwie ocenę związku ekspresji białka RAD51 z ryzykiem przerzutów do mózgu. W pracy Barbano wsp. [76] częstość ekspresji cytoplazmatycznej RAD51 w niewyselekcjonowanej populacji chorych na raka piersi wyniosła 63%, a jądrowej 24%. Z kolei w pracy Honrado wsp. [77], którzy badali chore na genetycznie uwarunkowanego raka piersi, odczyn jądrowy wystąpił w zależności od typu mutacji w 0 do 30% przypadków, a cytoplazmatyczny - w 12-57%. W niniejszym materiale ekspresja RAD51 występowała zarówno w grupach HER2-dodatnich, jak i ujemnych. Odczyn jądrowy występował względnie rzadko i nie różnił się pomiędzy grupami (17% i 11%). Nasilony odczyn cytoplazmatyczny znamiennie częściej występował u chorych z przerzutami do mózgu - odpowiednio u 70% w grupie badanej i u 40% w kontrolnej ($p<0,001$). Stwierdzono też związek pomiędzy ekspresją RAD51, zarówno na poziomie cytoplazmatycznym, jak i jądrowym, z krótszym czasem przeżycia po rozpoznaniu przerzutów do mózgu (odpowiednio 4,9 vs 5,6 miesięcy i 3,8 vs 5,2 miesięcy). Związek pomiędzy ekspresją RAD 51 a ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu potwierdzono również w analizie wieloczynnikowej ($p=0,001$).

Częstość ekspresji pozostałych białek, w tym CK5/6, E-kadheryny oraz klaudyny 3 i 4 była podobna w grupie badanej i kontrolnej. Dane na temat ich bezpośredniego związku z ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu są skąpe. Są one natomiast jednymi z molekularnych wykładników dwóch podtypów raka piersi - bazalnego i *claudin-low*, którym przypisuje się obecnie silny związek z ryzykiem rozsiewu do mózgu. Zaburzenia ekspresji E-kadheryny i białek z grupy klaudyn uznawane są również za marker procesu związanego ze zmianą fenotypu epitelialnego na mezenchymalny (EMT), odpowiedzialnego za nabycie przez komórki nowotworowe zdolności do tworzenia przerzutów [63-65]. Ekspresję CK5/6 w analizowanym materiale stwierdzono u 31% chorych w grupie badanej i u 21% w grupie kontrolnej, co mieściło się w granicach podawanych przez innych autorów u chorych z przerzutami do mózgu (24-50%) [93, 96, 97, 99]. Podobnie w przypadku E-kadheryny, białka którego utrata jest typowa dla niskozróżnicowanych raków

piersi oraz raka zrazikowego, odsetek silnie dodatnich odczynów nie różnił się pomiędzy grupami (odpowiednio 91 i 94%), pomimo że w grupie chorych z rozsiewem do mózgu częściej występował rak zrazikowy. Podobny odsetek guzów z obecnością wysokiej ekspresji E-kadheryny u chorych z przerzutami do mózgu wykazali Brogi i wsp. [93] – 91% oraz Gadecke i wsp. [96] – 83%.

Piśmiennictwo na temat roli białek z rodziny klaudyn w powstawaniu przerzutów do mózgu jest ubogie. W niniejszej pracy słabą ekspresję klaudyny 3 stwierdzono u 13% chorych z przerzutami do mózgu i u 9% w grupie kontrolnej, natomiast w przypadku klaudyny 4 w obu grupach słabą ekspresję stwierdzono u 3% chorych. W większości dostępnych badań z udziałem klaudyn, ocenę ekspresji przeprowadzano w podtypach raka potrójnie ujemnego lub w bardzo małych populacjach chorych [117, 118]. W jedynym większym badaniu, obejmującym 299 inwazyjnych raków piersi, silną ekspresję klaudyny 3 stwierdzono u 84%, a klaudyny 4 – u 66% chorych [90], co w odniesieniu do klaudyny 3 było wynikiem zbliżonym do uzyskanego w niniejszej pracy. Brak jest jednak wiarygodnych danych na temat rozkładu nasilenia ekspresji obu klaudyn w ogólnej populacji raka piersi, a w szczególności u chorych z przerzutami do mózgu.

Do tej pory nie udało się stworzyć profilu molekularnego, który na podstawie ekspresji wybranych białek w guzie pierwotnym umożliwiałby wyselekcjonowanie z dużym prawdopodobieństwem chorych na raka piersi o wysokim ryzyku rozwoju przerzutów do mózgu. Pewne próby zostały podjęte przez grupę Bos i wsp. [48] oraz Duchnowskiej i wsp. [50]. Badania te były jednak prowadzone z uwzględnieniem ekspresji genów, a nie białek. Dodatkowo Duchnowska i wsp. badali wyłącznie chore z nadekspresją lub amplifikacją genu *HER2*, a Bos i wsp. posłużyli się liniami komórkowymi raka piersi nie wykazującymi ekspresji ER. W niniejszej pracy oceną objęto wszystkie chore, niezależnie od podtypu molekularnego guza pierwotnego. W analizie jednoczynnikowej ryzyko rozsiewu do mózgu było znamiennie wyższe u chorych, u których w guzie pierwotnym występowała nadmierna ekspresja HER2 (HR 1,75), CK5/6 (HR 2,0), EGFR (HR 2,12), RAD51 zarówno w cytoplazmie (HR 2,42), jak i w jądrze (HR 2,04), CXCR4

w cytoplazmie (HR 1,50) oraz wysoka wartość markera proliferacji Ki67 (HR 2,99). Natomiast obecność ekspresji ER lub PR blisko trzykrotnie zmniejszała ryzyko rozsiewu do mózgu (odpowiednio HR 0,29 i 0,38). W analizie wieloczynnikowej związek z wysokim ryzykiem rozsiewu do mózgu stwierdzono dla nieobecności ER (HR 1,72, p=0,029), wysokiego Ki67 (HR 2,76; p<0,001) i ekspresji RAD51 w cytoplazmie (HR 1,87; p=0,014). Spośród 4 profilów stanowiących kombinację tych markerów, profil obejmujący RAD51, Ki67 oraz ER blisko 4,5-krotnie zwiększał ryzyko rozsiewu do mózgu w stosunku do pozostałych chorych z rozsianym rakiem piersi (HR 4,43; p<0,001). Analiza podtypów molekularnych, wykazała natomiast, że ryzyko przerzutów do mózgu było największe dla raków potrójnie ujemnych (HR 1,21; p<0,001), a najmniejsze dla podtypu luminalnego A (HR 0,25; p<0,001).

Poza porównaniem ekspresji wybranych białek związanych ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu, w niniejszej rozprawie przeprowadzono również analizę uwzględniającą poszczególne podtypy molekularne tego nowotworu. W dostępnym piśmiennictwie dane na temat molekularnych cech poszczególnych podtypów są rozbieżne. Najprostszy i najbardziej czytelny okazał się podział oparty na ocenie białek powszechnie dostępnych w diagnostyce IHC: ER, PR, HER2 i Ki67 [53, 70]. Dołączenie do tej analizy wyników oceny ekspresji CK5/6 i EGFR (metoda pięciu markerów), umożliwiło dodatkowo wyodrębnienie spośród guzów potrójnie ujemnych podtypu bazalnego. Udział chorych z przerzutami do mózgu w podtypie potrójnie ujemnym (w tym o fenotypie bazalnym) oraz HER2-dodatnim (zarówno nieluminalnym jak, i luminalnym B2) był dwukrotnie większy w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei w podtypie luminalnym A chore z przerzutami do mózgu stanowiły jedynie 25%. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy, choć z uwagi na brak jednolitych definicji poszczególnych podtypów molekularnych oraz przyjmowanie różnych punktów odcięcia dla oceny ekspresji poszczególnych białek, bezpośrednie porównanie wyników sprawia pewne trudności. Kennecke i wsp. [119] zbadali 3726 wycinków pochodzących od chorych na raka piersi i stwierdzili, że przerzuty do mózgu występowały znamiennie częściej w podtypach HER2-dodatnim nieluminalnym i luminalnym B HER2-dodatnim oraz bazalnym.

Podtyp molekularny raka piersi był najsilniejszym, niezależnym od klasycznych cech kliniczno-patologicznych, czynnikiem ryzyka rozsiewu. Również Sihto i wsp. [107], analizując związek pomiędzy typem molekularnym a lokalizacją pierwszego ogniska wtórnego, potwierdzili zwiększone ryzyko rozsiewu do mózgu u chorych z podtypem bazalnym. Gadecke i wsp. [96] także wskazali na typ bazalny i dodatkowo HER2-dodatni, jako związane z podwyższonym ryzykiem przerzutów do mózgu. Takie same wyniki osiągnęli Smid i wsp. [120] w badaniu obejmującym 344 chore po pierwotnym leczeniu miejscowym z powodu wczesnego raka piersi. Stwierdzili oni, że wśród chorych z przerzutami do mózgu wyraźnie dominował podtyp bazalny oraz HER2-dodatni (odpowiednio 57% i 21% ogółu chorych). Harell i wsp. [62], w badaniu na mikromacierzach DNA, także potwierdzili silny związek pomiędzy fenotypem bazalnym i *claudin-low* a ryzykiem rozsiewu do mózgu.

Obserwowane zjawisko predylekcji wybranych podtypów molekularnych do kolonizacji konkretnych narządów wydaje się potwierdzać słuszność teorii „ziarna i gleby", która zakłada istnienie konkretnego fenotypu komórki nowotworowej, umożliwiającego jej dotarcie i przeżycie w określonym typie tkanki, sprzyjającym jej rozwojowi.

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują, że w przebiegu raka piersi, nieobecność ekspresji ER i PR w guzie pierwotnym, a także wysoki wskaźnik Ki67 oraz nadmierna ekspresja HER2, EGFR, CXCR4 i białka RAD51, wiążą się z ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu, podobnie jak obecność fenotypu potrójnie ujemnego. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że spośród wymienionych białkowych markerów, niezależną wartość predykcyjną dla przerzutów do mózgu wykazuje wysoki wskaźnik proliferacji Ki67, ekspresja w cytoplazmie RAD51 oraz nieobecność ekspresji ER. Profil z udziałem tych trzech białek blisko 4,5-krotnie zwiększał ryzyko rozsiewu do mózgu.

Z uwagi na retrospektywny charakter pracy, względnie niewielką liczebność podgrup oraz potencjalny wpływ schematów systemowego leczenia na naturalny przebieg choroby, uzyskane wyniki należy interpretować z dużą ostrożnością. Nie bez znaczenia pozostaje również subiektywność oceny

odczynów immunohistochemicznych oraz brak standardów barwienia dla przeciwciał rzadko stosowanych w diagnostyce onkologicznej. Wartość profilu ekspresji badanych białek dla oceny ryzyka wystąpienia przerzutów do mózgu należałoby zatem poddać walidacji w dużych, niezależnych grupach chorych na zaawansowanego raka piersi. Niezależnie od tego, ocena taka wydaje się również uzasadniona u chorych we wcześniejszych stadiach raka piersi. Aplikacyjna wartość uzyskanych wyników w aspekcie m.in. działań profilaktycznych, wymagałaby przeprowadzenia prospektywnych badań z losowym doborem chorych.

VI. Wnioski

1. Ocena ekspresji wybranych białek w pierwotnym ognisku raka piersi pozwala wyodrębnić spośród chorych w stadium rozsiewu podgrupy o szczególnie wysokim ryzyku przerzutów do mózgu.
2. Ryzyko rozsiewu do mózgu w tej grupie związane jest z wysoką aktywnością proliferacyjną, hormonoopornością i zaburzeniami naprawy DNA w komórkach nowotworu, a także z potrójnie ujemnym i HER2-dodatnim fenotypem raka piersi.

VII. Streszczenie

Przerzuty do mózgu występują u 10 do 30% chorych na raka piersi. Średni czas przeżycia bez leczenia wynosi u chorych z przerzutami do mózgu od 1 do 2 miesięcy, a po zastosowaniu paliatywnej radioterapii – od 3 do 6 miesięcy. Dotychczas nie udało się w pełni wyjaśnić mechanizmów, które odpowiadają za powstanie przerzutów do mózgu. Do tej pory nie zostały także określone molekularne cechy guza pierwotnego, które ułatwiłyby identyfikację chorych o zwiększonym ryzyku wystąpienia przerzutów w tej lokalizacji i umożliwił podjecie profilaktyki lub wcześniejszego leczenia.

Celem pracy była analiza ekspresji wybranych białek oraz molekularnych podtypów związanych ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu u chorych na raka piersi.

Analizą objęto 198 chorych na rozsianego raka piersi, w tym grupę badaną 96 chorych z przerzutami do mózgu oraz grupę kontrolną 102 chorych o innej lokalizacji przerzutów.

Analizę immunohistochemiczną wycinków z guzów pierwotnych utrwalonych w formalinie i zatopionych w blokach parafinowych przeprowadzono przy użyciu techniki mikromacierzy tkankowych. Do oceny użyto przeciwciał dla ER, PR, HER2, Ki67, CK5/6, EGFR, HER3, CXCR4, RAD51, E-kadheryny, klaudyny 3 i 4.

W analizie jednoczynnikowej wykazano, że u chorych z przerzutami do mózgu znamiennie częściej w porównaniu do chorych bez przerzutów występowały: nadmierna ekspresja HER2 ($p=0,011$), ekspresja EGFR ($p=0,022$), CXCR4 (odczyn cytoplazmatyczny; $p=0,001$), RAD51 (odczyn cytoplazmatyczny; $p<0,001$), wysoka wartość (≥14%) markera proliferacji Ki67 ($p<0,001$) oraz nieobecność ekspresji ER ($p<0,001$) i PR ($p<0,001$). W analizie wieloczynnikowej niezależnymi czynnikami ryzyka wystąpienia przerzutów do mózgu okazały się ekspresja RAD51 w cytoplazmie ($p=0,001$) oraz marker proliferacji Ki67 ($p=0,001$). Chore z rozsiewem do mózgu

przeważały wśród guzów o fenotypie potrójnie ujemnym oraz HER2-dodatnim (luminalnym i nieluminalnym), natomiast stanowiły mniejszość w podtypie luminalnym A. W podtypie luminalnym B HER2-ujemnym udział chorych obu grup był zrównoważony (p<0,001).

Na podstawie ekspresji badanych białek dodatkowo przeprowadzono analizę względnego ryzyka przerzutów do mózgu. W analizie tej ryzyko rozsiewu do mózgu było znamiennie wyższe u chorych, u których w guzie pierwotnym występowała nadmierna ekspresja HER2 (HR 1,75), CK5/6 (HR 2,0), EGFR (HR 2,12), RAD51 zarówno w cytoplazmie (HR 2,42), jak i w jądrze (HR 2,04), CXCR4 w cytoplazmie (HR 1,50) lub wysoka wartość markera proliferacji Ki67 (HR 2,99). Brak obecności ekspresji ER lub PR około trzykrotnie zwiększał ryzyko rozsiewu do mózgu (HR odpowiednio 3,44 i 2,63). W analizie wieloczynnikowej związek z wysokim ryzykiem rozsiewu do mózgu miała nieobecność ekspresji ER (HR 1,72, p=0,029), wysoka ekspresja Ki67 (HR 2,76; p<0,001) i RAD51 w cytoplazmie (HR 1,87; p=0,014). Na podstawie wyników analizy wieloczynnikowej stworzono cztery profile molekularne. Profil składający się z ER, Ki67 oraz RAD51 wiązał się z ponad czterokrotnie większym ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgu (HR 4,43; p<0,001).

Uzyskane wyniki wykazały istotne różnice w profilu ekspresji wybranych białek: ER, PR, HER2, Ki67, EGFR, CK5/6, CXCR4, RAD51 w pierwotnym ognisku raka piersi w grupach chorych z przerzutami i bez przerzutów do mózgu. Niezależnymi czynnikami związanymi z ryzykiem rozsiewu do mózgu są wysoka ekspresja cytoplazmatyczna RAD51, wysoki wskaźnik proliferacji Ki67 oraz nieobecność ekspresji ER, będącymi wykładnikami odpowiednio zaburzeń naprawy DNA, wysokiej zdolności proliferacyjnej i hormonooporności nowotworu. Profil zawierający trzy wymienione markery pozwala wyodrębnić podgrupę chorych na raka piersi o szczególnie wysokim ryzyku wystąpienia przerzutów do mózgu. Ryzyko to jest wysokie również u chorych z potrójnie ujemnym i HER2-dodatnim podtypem raka piersi. Uzyskane wyniki mają wstępny charakter i wymagają potwierdzenia w kolejnych badaniach, zwłaszcza w aspekcie ich aplikacyjnej wartości.

VIII. Summary

Analysis of selected molecular markers related to high risk of brain metastases in breast cancer patients

Brain metastases are present in 10 to 30% of breast cancer patients. In patients with brain metastases the median survival without treatment is 1 – 2 months, and after palliative radiotherapy 3 - 6 months. The mechanism of brain metastases remains largely unknown. The identification of molecular markers might help in selecting breast cancer patients at high risk of brain metastases and thus enable prevention and early treatment.

The aim of this study was to analyse expression profile of selected tumour proteins and molecular subtypes in relation to risk of brain metastases in breast cancer patients.

The study population comprised of 198 disseminated breast cancer patients, including 96 and 102 woman with and without brain metastases respectively.

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed paraffin embedded primary tumour microarray cores. Expression of ER, PR, HER2, Ki67, CK5/6, EGFR, HER3, CXCR4, RAD51, E-kadheryny, and klaudin 3 and 4 was analysed.

In the univariate analysis breast cancer patients with brain metastases were more likely to be negative for ER, PR and positive for HER2 ($p=0.011$), EGFR ($p=0.022$), CXCR4 (cytoplasmatic staining) ($p=0.001$), RAD51 (cytoplasmatic staining) ($p<0.001$) and high (≥14%) proliferation marker Ki67 ($p<0.001$).

Ki67 and RAD51 (cytoplasmatic staining) were independent predictive factors for brain metastases in multivariate analysis ($p=0.001$). Patients with brain metastases prevailed in triple-negative andHER2-positive (luminal and no luminal) subtypes, whereas they constituted the minority among luminal A cases; in luminal B HER2-negative subset the proportion of patient with and without brain metastases was balanced.

Study markers were also analyzed in terms of their association with the relative risk of brain metastases. Women with high expression of HER2 (HR 1.75), CK5/6 (HR 2.0), EGFR (HR 2.12), RAD51 (both cytoplasmatic and nucleus staining, HR 2.42 and 2.04), CXCR4 (cytoplasmatic staining, HR 1.50) or high proliferation marker Ki67 (HR 2.99) and negative ER or PR (HR 3.44 and 2.63), were at high risk of brain metastases in the univariate analysis. High expression of Ki67 (HR 2.76; $p<0.001$), RAD51 (cytoplasmatic staining, HR 1.87; $p=0.014$) and negative ER (HR 1.72, $p=0.029$), significantly increased the risk of brain metastases in the multivariate analysis. Four molecular profiles including markers found to be significant in the multivariate analysis were created. Of those, a three-marker profile (ER, Ki67 and RAD51) was associated with the highest risk of brain metastases (HR 4.43; $p<0.001$).

These results demonstrate significant differences in expression of ER, PR, HER2, Ki67, EGFR, CK5/6, CXCR4 and RAD51 in primary tumour between breast cancer patients with and without brain metastases. High cytoplasmatic expression of RAD51 and Ki67 are independent risk factors for brain metastases. Molecular profile including three above mentioned markers allows to select a subgroup of breast cancer patients at particularly high risk of brain metastases. Risk of brain metastases is also high in triple negative and HER2-positive groups. These results should be considered preliminary and warrant confirmation in future studies, particularly in terms of their applicability in the clinics.

IX. Wykaz skrótów używanych w pracy

BRCA1: ang**.** *breast cancer type 1 susceptibility protein homolog*

BRCA2: ang. *breast cancer type 2 susceptibility protein homolog*

LDH: ang. *lactate dehydrogenase;* dehydrogenaza mleczanowa

CXCR4: ang. *chemokine receptor type 4;* receptor dla chemokiny typu 4

CXCL12: ang. *chemokine (C-X-C motif) ligand 12;* ligand dla chemokiny

CX3CR1: ang. *chemokine (C-X3-C) receptor 1;* receptor dla chemokiny typu 1

EGFR: ang. *epidermal growth factor receptor;* receptor naskórkowego 4 czynnika wzrostu.

HER2: ang. *human epidermal growth factor receptor 2;* receptor naskórkowego czynnika wzrostu 2.

HER3: ang. *human epidermal growth factor receptor 3;* receptor naskórkowego czynnika wzrostu 3.

OUN: ośrodkowy układ nerwowy

MDR-1: ang. *multidrug resistance – 1;* oporność wielolekowa typu 1

MMP: ang. *matrix metalloproteinase*; metaloproteinaza

FISH: ang. *fluorescence in situ hybrydization;* test hybrydyzacji *in situ*

ER: receptor estrogenowy

PgR: receptor progesteronowy

ANGPTL4: ang. *angiopoietin-like 4 gene;* gen angiopoetyno-4-podobny

LTBP1: ang. *latent transforming growth factor beta binding protein;* białko wiążące TGF-beta

FSCN1: ang. *fascin homolog 1;* homolog fascyny 1

HBEGF: ang. *heparin-binding EGF-like growth factor;* nabłonkowy czynnik wzrostu wiążący heparyny

EREG: ang. *epiregulin;* epiregulina

CDK4: ang. *cyclin dependent kinase 4;* cyklino-zależna kinaza 4

CCNC: ang. *cyclin C;* cyklina C

PTK2: ang. *protein tyrosine kinase 2;* kinaza tyrozynowa 2

MYC: ang. *myelocytomatosis viral oncogene homologue*

BARD1: ang. *BRCA1 associated RING domain 1*

RAD 51: ang. *RAD51 homologue*

FANCG: ang. *Fanconi complementation anemia group G*

PCNA: ang. *proliferating cell nuclear antigen*

PRCC: ang. *papillary renal cell carcinoma (translocation-associated)*

TPR: ang. *translocated promoter region*

EMS1: ang. *cortactin;* kortaktyna

DSP: ang. *desmoplakin;* desmoplakina

HDGF: ang. *hepatocyte derived growth factor;* czynnik wzrostu hepatocytów

MRI: ang. *magnetic resonanse imaging;* rezonans magnetyczny

TK: tomograf komputerowy

G: ang. *grade;* zróżnicowanie

p: poziom istotności statystycznej

RT-PCR: ang. *reverse transcriptase-polymerase chain reaction;* reakcja łańcuchowa odwrotnej transkryptazy-polimerazy

RPA: ang. *recursive partitioning analysis*

GPA: ang. *graded prognostic assessment*

BSBM: ang. *basic score for brain metastases*

SIR: ang. *score index for radiosurgery*

EMT: ang. *epithelial–mezenchyma transition*; zmiana fenotypu nabłonkowego na mezenchymalny

PDGF: ang. *platelet-derived growth factor*; płytkopochodny czynnik wzrostu

TGFβ: ang. *transforming growth factor*; transformujący czynnik wzrostu

IX. Piśmiennictwo

1. Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2009 roku. Centrum Onkologii Instytut, Warszawa 2011
2. De Angelis R, Francisci S, Baili P i wsp. EUROCARE Working Group. The EUROCARE-4 database on cancer survival in Europe: data standardisation, quality control and methods of statistical analysis. Eur J Cancer. 2009;45:909-30.
3. Lin NU, Bellon JR, Winer EP. CNS metastases in breast cancer. J Clin Oncol. 2004;22:3608-17.
4. Duchnowska R, Dziadziuszko R, Czartoryska-Arłukowicz B i wsp. Risk factors for brain relapse in HER2-positive metastatic breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat. 2009;117:297-303.
5. Brogi E, Murphy CG, Johnson ML i wsp. Breast carcinoma with brain metastases: clinical analysis and immunoprofile on tissue microarrays. Ann Oncol. 2011;22:2597-603.
6. Atahan IL, Ozyigit G, Yildiz F, i wsp. Percent positive axillary involvement predicts for the development of brain metastasis in high-risk patients with nonmetastatic breast cancer receiving post-mastectomy radiotherapy. Breast J. 2008;14:245-9.
7. Evans AJ, James JJ, Cornford EJ i wsp. Brain metastases from breast cancer: identification of a high-risk group. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2004;16:345-9.
8. Slimane K, Andre F, Delaloge S i wsp. Risk factors for brain relapse in patients with metastatic breast cancer. Ann Oncol. 2004;15:1640-4.
9. Crivellari D, Pagani O, Veronesi A i wsp. International Breast Cancer Study Group. High incidence of central nervous system involvement in patients with metastatic or locally advanced breast cancer treated with epirubicin and docetaxel. Ann Oncol. 2001;12:353-6.
10. Carey LA, Ewend MG, Metzger R i wsp. Central nervous system

metastases in women after multimodality therapy for high risk breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2004;88:273-80.

11. Preusser M, Capper D, Ilhan-Mutlu A i wsp. Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies. Acta Neuropathol. 2012;123:205-22.

12. Bria E, Cuppone F, Fornier M i wsp. Cardiotoxicity and incidence of brain metastases after adjuvant trastuzumab for early breast cancer: the dark side of the moon? A meta-analysis of the randomized trials. Breast Cancer Res. Treat. 2008;109:231–39.

13. Lear-Kaul KC, Yoon HR, Kleinschmidt-DeMasters BK i wsp. Her-2/neu status in breast cancer metastases to the central nervous system. Arch Pathol Lab Med 2003;127:1451-7.

14. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S i wsp. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med. 2001;344:783-92.

15. Sze G, Milano E, Johnson C i wsp. Detection of brain metastases: comparison of contrast-enhanced MR with unenhanced MR and enhanced CT. AJNR Am J Neuroradiol 1999;11:785-91.

16. Niwińska A, Tacikowska M, Murawska M. The effect of early detection of occult brain metastases in HER2-positive breast cancer patients on survival and cause of death. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010;77:1134-9.

17. DiStefano A, Yong Yap Y, Hortobagyi GN i wsp. The natural history of breast cancer patients with brain metastases. Cancer 1979;44:1913-8.

18. Delattre JY, Krol G, Thaler HT i wsp. Distribution of brain metastases. Arch Neurol 1988; 45:741-4.

19. DiStefano A, Yong Yap Y, Hortobagyi GN i wsp. The natural history of breast cancer patients with brain metastases. Cancer. 1979;44:1913-8.

20. Schiff D, Batchelor T, Wen PY. Neurologic emergencies in cancer

patients. Neurol Clin 1998;16:449-54.

21. Sperduto PW, Kased N, Roberge D i wsp. Summary report on the graded prognostic assessment: an accurate and facile diagnosis-specific tool to estimate survival for patients with brain metastases. J Clin Oncol. 2012;30:419-25.

22. Nieder C, Marienhagen K, Astner ST i wsp. Prognostic scores in brain metastases from breast cancer. BMC Cancer. 2009;9:105.

23. Melisko ME, Kunwar S, Prados M i wsp. Brain metastases of breast cancer. Expert Rev Anticancer Ther. 2005;5:253-68.

24. Pieper DR, Hess KR, Sawaya RE. Role of surgery in the treatment of brain metastases in patients with breast cancer. Ann Surg Oncol. 1997;4:481-90.

25. Vecht CJ, Haaxma-Reiche H, Noordijk EM i wsp. Treatment of single brain metastasis: radiotherapy alone or combined with neurosurgery? Ann Neurol. 1993;33:583-90.

26. Dawood S, Broglio K, Esteva FJ i wsp. Defining prognosis for women with breast cancer and CNS metastases by HER2 status. Ann Oncol. 2008;19:1242-8.

27. Stemmler HJ, Heinemann V. Central nervous system metastases in HER-2 overexpressing metastatic breast cancer: a treatment challenge. Oncologist. 2008;13:739-50.

28. Stemmler HJ, Schmitt M, Willems A i wsp. Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier. Anticancer Drugs. 2007;18:23-8.

29. Lin NU, Diéras V, Paul D i wsp. Multicenter phase II study of lapatinib in patients with brain metastases from HER2-positive breast cancer. Clin Cancer Res. 2009;15:1452-9.

30. Taskar KS, Rudraraju V, Mittapalli RK i wsp. Lapatinib Distribution in HER2 Overexpressing Experimental Brain Metastases of Breast Cancer.

Pharm Res. 2012;29:770-81.

31. Fidler IJ. The role of the organ microenvironment in brain metastasis. Semin Cancer Biol. 2011;21:107-12.

32. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer. 2002;2:563-72.

33. Bart J, Groen H, Hendrikse N i wsp. The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. Cancer Treat Rev. 2000;26:449–62.

34. Doolittle ND, Peereboom DM, Christoforidis GA i wsp. Delivery of chemotherapy and antibodies across the blood-brain barrier and the role of chemoprotection, in primary and metastatic brain tumors: report of the Eleventh Annual Blood-Brain Barrier Consortium meeting. J Neurooncol. 2007;81:81-91.

35. Maki DD, Grossman RI. Patterns of disease spread in metastatic breast carcinoma: influence of estrogen and progesterone receptor status. AJNR Am J Neuroradiol. 2000;21:1064-6.

36. Gabos Z, Sinha R, Hanson J i wsp. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. J Clin Oncol. 2006;24:5658-63.

37. Clayton AJ, Danson S, Jolly S i wsp. Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab for metastatic breast cancer. Br J Cancer. 2004;91:639-43.

38. Nam BH, Kim SY, Han HS i wsp. Breast cancer subtypes and survival in patients with brain metastases. Breast Cancer Res. 2008;10:R20.

39. Hicks DG, Short SM, Prescott NL i wsp. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. Am J Surg Pathol. 2006;30:1097-104

40. Da Silva L, Simpson PT, Smart CE i wsp. HER3 and downstream

pathways are involved in colonization of brain metastases from breast cancer. Breast Cancer Res. 2010;12:R46.

41. Chiu CG, Masoudi H, Leung S i wsp. HER-3 overexpression is prognostic of reduced breast cancer survival: a study of 4046 patients. Ann Surg. 2010;251:1107-16.

42. Da Silva L, Simpson PT, Smart CE i wsp. HER3 and downstream pathways are involved in colonization of brain metastases from breast cancer. Breast Cancer Res. 2010;12:R46.

43. Lee BC, Lee TH, Avraham S i wsp. Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. Mol Cancer Res.Mol Cancer Res. 2004;2:327-38.

44. Andre F, Cabioglu N, Assi H i wsp. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. Ann Oncol. 2006;17:945-51.

45. Schmid BC, Rezniczek GA, Fabjani G i wsp. The neuronal guidance cue Slit2 induces targeted migration and may play a role in brain metastasis of breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2007;106:333-42.

46. Linderholm B, Grankvist K, Wilking N i wsp. Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. J Clin Oncol. 2000;18:1423-31.

47. Mendes O, Kim HT, Stoica G. Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model. Clin Exp Metastasis. 2005;22:237-46.

48. Bos PD, Zhang XH, Nadal C i wsp. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. Nature. 2009;459:1005-9.

49. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM i wsp. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. Nature. 2005;436:518-24.

50. Duchnowska R, Jassem J, Thorat MA i wsp. Gene expression analysis

for prediction of early brain metastasis (BM) in HER2-positive (HER2+) breast cancer patients (pts). J Clin Oncol 26: 2008 (May 20 suppl; abstr 1019).

51. Duchnowska R, Jassem J, Goswami C i wsp. A 13-gene signature predicting rapid development of brain metastases in HER2-positive advanced breast cancer patients contains multiple DNA double strand break repair genes. W druku, udostępnione za zgodą autora.

52. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB i wsp. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000;406:747-52.

53. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS i wsp. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. Ann Oncol. 2011;22:1736-47.

54. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C i wsp. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. Clin Cancer Res. 2008;14:1368-76.

55. Tan DS, Marchió C, Jones RL i wsp. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. Breast Cancer Res Treat. 2008;111:27-44.

56. Smid M, Wang Y, Zhang Y i wsp. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. Cancer Res. 2008;68:3108-14.

57. Luck AA, Evans AJ, Green AR i wsp. The influence of basal phenotype on the metastatic pattern of breast cancer. Clin Oncol (R Coll Radiol). 2008;20:40-5.

58. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R i wsp. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. J Clin Oncol 2010;28:3271–3277.

59. Yonemori K, Tsuta K, Ono M i wsp. Disruption of the blood brain barrier by brain metastases of triple-negative and basal-type breast cancer but not HER2/neu-positive breast cancer. Cancer. 2010;116:302-8.

60. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ i wsp. Identification of conserved

gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. Genome Biol 2007;8: R76.

61. Prat A, Parker JS, Karginova O i wsp. Phenotypic and molecular characterization of the claudin low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Res; 2010;12:R68.

62. Harrell JC, Prat A, Parker JS i wsp. Differentiation Score and Intrinsic Subtype Predict Breast Cancer Organ of Relapse. W druku, udostępnione za zgodą autora.

63. Thiery JP, Acloque H, Huang RY i wsp. Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. Cell 2009;139:871-890.

64. Polyak K, Weinberg RA: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. Nat Rev Cancer 2009; 9:265-273.

65. May CD, Sphyris N, Evans KW i wsp. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. Breast Cancer Res. 2011;13:202.

66. Hewitt SM. Tissue microarrays as a tool in the discovery and validation of predictive biomarkers. Methods Mol Biol. 2012;823:201-14.

67. Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. J Clin Oncol. 2008;26:5630-7.

68. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. Lab Invest. 2000;80:1943-9.

69. Gerdes J, Schwab U, Lemke H i wsp. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer. 1983;31:13-20.

70. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M J Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. Clin Oncol. 2005;23:7212-20.

71. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K i wsp. Immunohistochemical and clinical

characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. Clin Cancer Res. 2004;10:5367-74.

72. Ramos EA, Grochoski M, Braun-Prado K i wsp. Epigenetic changes of CXCR4 and its ligand CXCL12 as prognostic factors for sporadic breast cancer. PLoS One. 2011;6:e29461.

73. Salmaggi A, Maderna E, Calatozzolo C i wsp. CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression in brain metastases. Cancer Biol Ther. 2009;8:1608-14.

74. Hinton CV, Avraham S, Avraham HK. Role of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in breast cancer metastasis to the brain. Clin Exp Metastasis. 2010;27:97-105.

75. Qiao GB, Wu YL, Yang XN i wsp. High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. Br J Cancer. 2005;93:137-43**.**

76. Barbano R, Copetti M, Perrone G i wsp. High RAD51 mRNA expression characterize estrogen receptor-positive/progesteron receptor-negative breast cancer and is associated with patient's outcome. Int J Cancer. 2011;129:536-45.

77. Honrado E, Osorio A, Palacios J i wsp. Immunohistochemical expression of DNA repair proteins in familial breast cancer differentiate BRCA2-associated tumors. J Clin Oncol. 2005;23:7503-11.

78. Guarino, M., B. Rubino, and G. Ballabio, The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. Pathology, 2007;39:305-18.

79. Asgeirsson KS, Jónasson JG, Tryggvadóttir L i wsp. Altered expression of E-cadherin in breast cancer. patterns, mechanisms and clinical significance. Eur J Cancer. 2000;36:1098-106.

80. Gould Rothberg BE, Bracken MB. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis. Breast Cancer Res

Treat. 2006;100:139-48.

81. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Mol Oncol. 2011;5:5-23.

82. Graesslin O, Abdulkarim BS, Coutant C i wsp. Nomogram to predict subsequent brain metastasis in patients with metastatic breast cancer. J Clin Oncol. 2010;28:2032-7

83. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M i wsp. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. J Clin Oncol. 2010;28:2784-95.

84. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN i wsp. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol. 2007;25:118-45.

85. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D i wsp. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. J Natl Cancer Inst 2009;101:736–750.

86. Diallo-Danebrock R, Ting E, Gluz O i wsp. Protein expression profiling in high-risk breast cancer patients treated with high-dose or conventional dose-dense chemotherapy. Clin Cancer Res. 2007;15;13:488-97.

87. Woo SU, Bae JW, Kim CH i wsp. A significant correlation between nuclear CXCR4 expression and axillary lymph node metastasis in hormonal receptor negative breast cancer. Ann Surg Oncol. 2008;15:281-5.

88. Munirah MA, Siti-Aishah MA, Reena MZ i wsp. Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. Rom J Morphol Embryol. 2011;52:669-77.

89. Tang D, Xu S, Zhang Q i wsp. The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast

cancer. Med Oncol. 2011.

90. Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH i wsp. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. Virchows Arch. 2009;454:647-56.

91. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Price KN i wsp. International Breast Cancer Study Group (IBCSG). Identifying breast cancer patients at risk for Central Nervous System (CNS) metastases in trials of the International Breast Cancer Study Group (IBCSG). Ann Oncol. 2006;17:935.

92. Ryberg M, Nielsen D, Osterlind K i wsp. Predictors of central nervous system metastasis in patients with metastatic breast cancer. A competing risk analysis of 579 patients treated with epirubicin-based chemotherapy. Breast Cancer Res Treat. 2005;91:217-25.

93. Brogi E, Murphy CG, Johnson ML i wsp. Breast carcinoma with brain metastases: clinical analysis and immunoprofile on tissue microarrays. Ann Oncol. 2011;22:2597-603.

94. Pestalozzi BC, Francis P, Quinaux E i wsp. BIG 02-98 Collaborative Group. Is risk of central nervous system (CNS) relapse related to adjuvant taxane treatment in node-positive breast cancer? Results of the CNS substudy in the intergroup Phase III BIG 02-98 Trial. Ann Oncol. 2008;19:1837-41.

95. Lai R, Dang CT, Malkin MG i wsp. The risk of central nervous system metastases after trastuzumab therapy in patients with breast carcinoma. Cancer. 2004;101:810-6.

96. Gaedcke J, Traub F, Milde S i wsp. Predominance of the basal type and HER-2/neu type in brain metastasis from breast cancer. Mod Pathol. 2007;20:864-70.

97. Yonemori K, Tsuta K, Shimizu C i wsp. Immunohistochemical profiles of brain metastases from breast cancer. J Neurooncol. 2008;90:223-8.

98. Tham YL, Sexton K, Kramer R i wsp. Primary breast cancer phenotypes associated with propensity for central nervous system metastases.

Cancer. 2006;107:696-704.

99. Shao MM, Liu J, Vong JS i wsp. A subset of breast cancer predisposes to brain metastasis. Med Mol Morphol. 2011;44:15-20.

100. Altundag K, Bondy ML, Mirza NQ i wsp. Clinicopathologic characteristics and prognostic factors in 420 metastatic breast cancer patients with central nervous system metastasis. Cancer. 2007;110:2640-7.

101. Hicks DG, Short SM, Prescott NL i wsp. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. Am J Surg Pathol. 2006;30:1097-104.

102. Grupka NL, Lear-Kaul KC, Kleinschmidt-DeMasters BK i wsp. Epidermal growth factor receptor status in breast cancer metastases to the central nervous system. Comparison with HER-2/neu status. Arch Pathol Lab Med. 2004;128:974-9.

103. Tsutsui S, Ohno S, Murakami S i wsp. Prognostic value of the combination of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in breast cancer. Surgery. 2003;133:219-21.

104. Harris AL, Nicholson S, Sainsbury R i wsp. Epidermal growth factor receptor and other oncogenes as prognostic markers. J Natl Cancer Inst Monogr. 1992;11:181-7.

105. Tham YL, Sexton K, Kramer R i wsp. Primary breast cancer phenotypes associated with propensity for central nervous system metastases. Cancer. 2006;107:696-704.

106. Sassen A, Rochon J, Wild P i wsp. Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. Breast Cancer Res. 2008;10:R2.

107. Sihto H, Lundin J, Lundin M i wsp. Breast cancer biological subtypes and protein expression predict for the preferential distant metastasis sites: a nationwide cohort study. Breast Cancer Res. 2011;13:R87.

108. Skarlos C. Christodoulou K. T. Kalogeras Triple-negative phenotype is of

adverse prognostic value in patients treated with dose-dense sequential adjuvant chemotherapy: a translational research analysis in the context of a Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) randomized phase III trial. Cancer Chemother Pharmacol. 2012;69:533-46.

109. Witton CJ, Reeves JR, Going JJ i wsp. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. J Pathol. 2003;200:290-7.

110. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE i wsp. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. Breast. 2008;17:323-34.

111. Barbareschi M, Girlando S, Mauri FM i wsp. Quantitative growth fraction evaluation with MIB1 and Ki67 antibodies in breast carcinomas. Am J Clin Pathol. 1994;102:171-5.

112. Petit T, Wilt M, Velten M i wsp. Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. Eur J Cancer. 2004;40:205-11.

113. Chang J, Ormerod M, Powles TJ i wsp. Apoptosis and proliferation as predictors of chemotherapy response in patients with breast carcinoma. Cancer. 2000;89:2145-52.

114. Su YC, Wu MT, Huang CJ i wsp. Expression of CXCR4 is associated with axillary lymph node status in patients with early breast cancer. Breast. 2006;15:533-9.

115. Salvucci O, Bouchard A, Baccarelli A i wsp. The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study. Breast Cancer Res Treat. 2006;97:275-83.

116. Li YM, Pan Y, Wei Y i wsp. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. Cancer Cell. 2004;6:459-69.

117. Tokés AM, Kulka J, Paku S i wsp. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. Breast Cancer Res. 2005;7:R296-305.

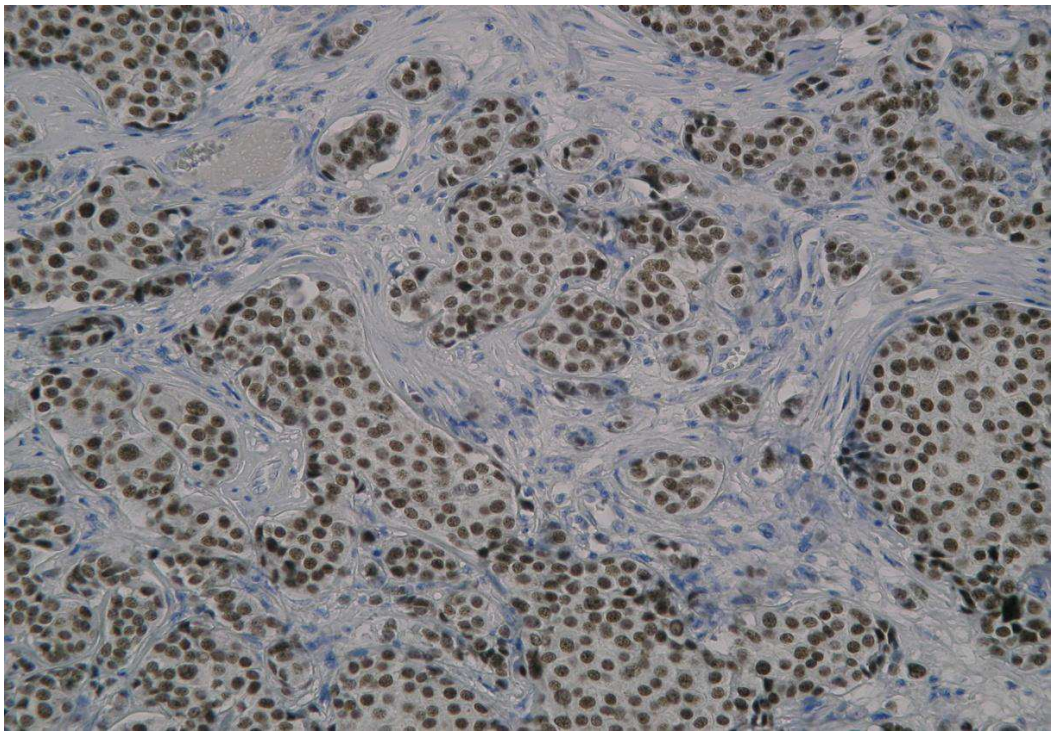
118. Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. Histopathology. 2005;46:551-60.

119. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R i wsp. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. J Clin Oncol. 2010;28:3271-7.

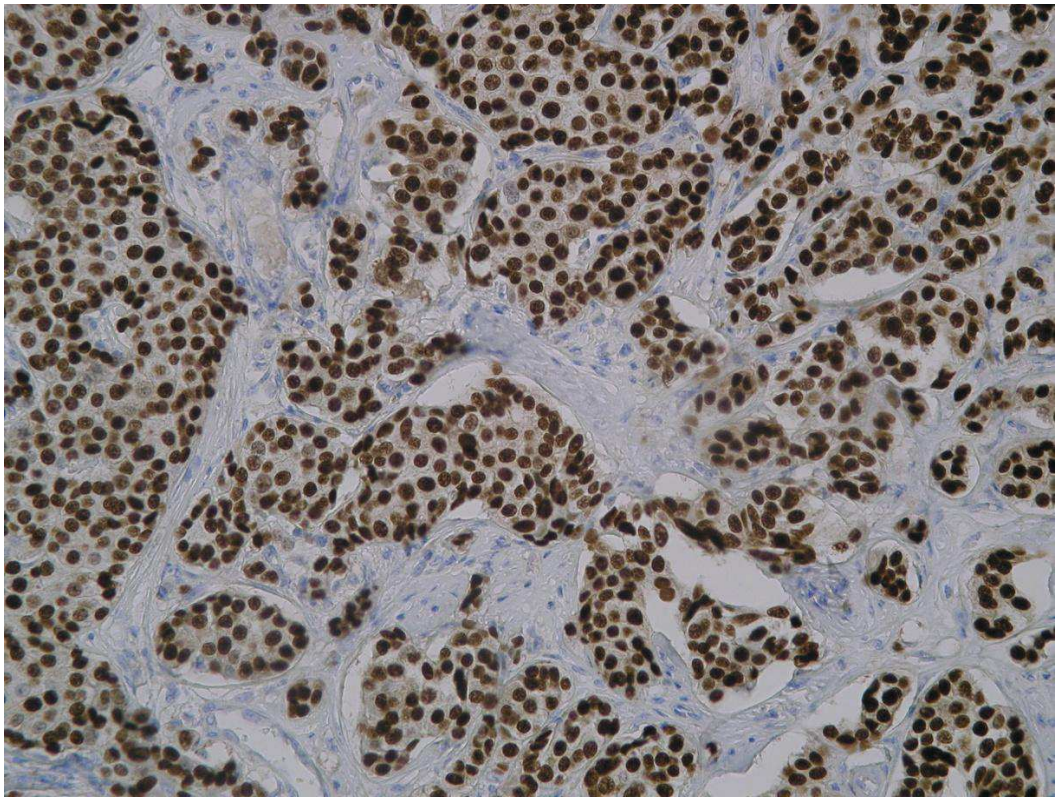
120. Smid M, Wang Y, Zhang Y i wsp. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. Cancer Res. 2008;68:3108-14.

X. Dokumentacja fotograficzna

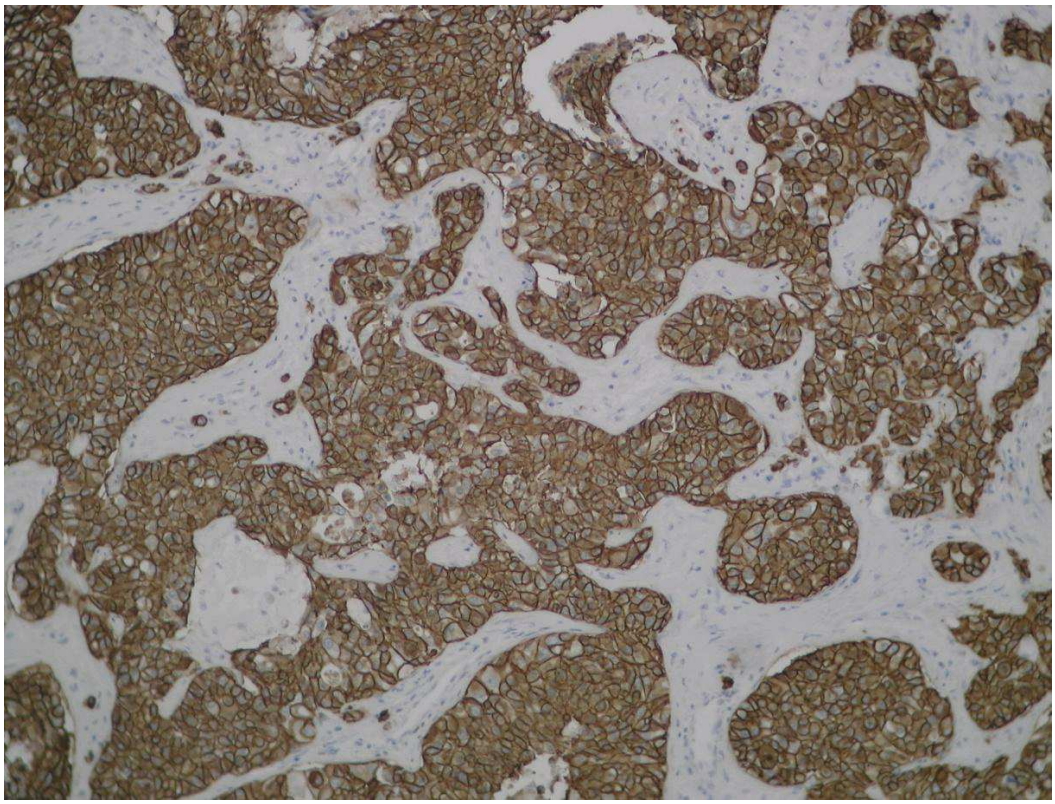
Fot. 1. Dodatni odczyn jądrowy dla receptora estrogenowego, powiększenie 20x



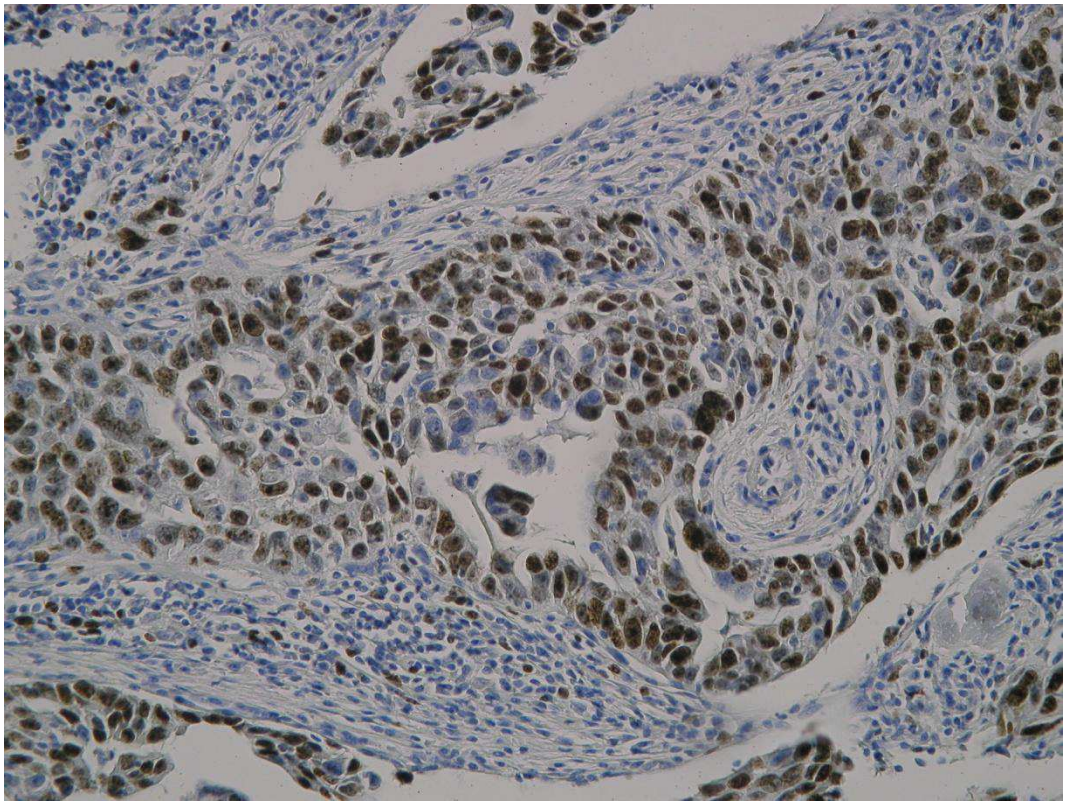
Fot. 2. Dodatni odczyn jądrowy dla receptora progesteronowego, powiększenie 20x



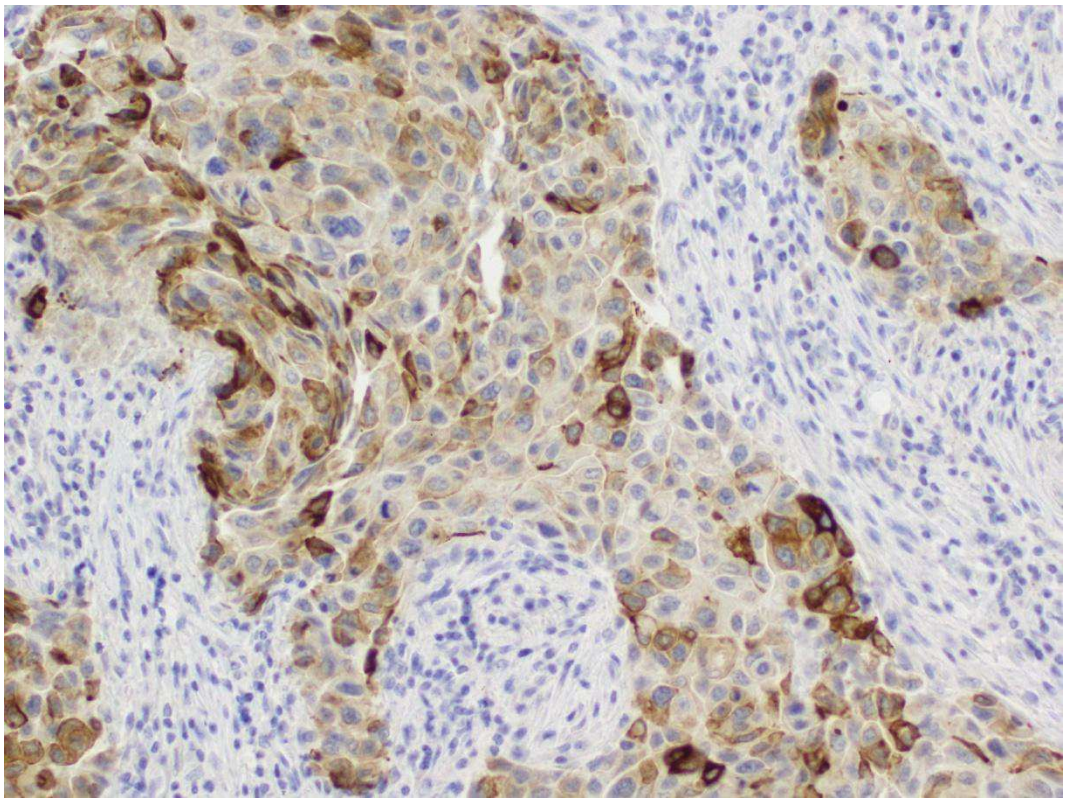
Fot. 3. Dodatni odczyn błonowy dla HER2, powiększenie 20x



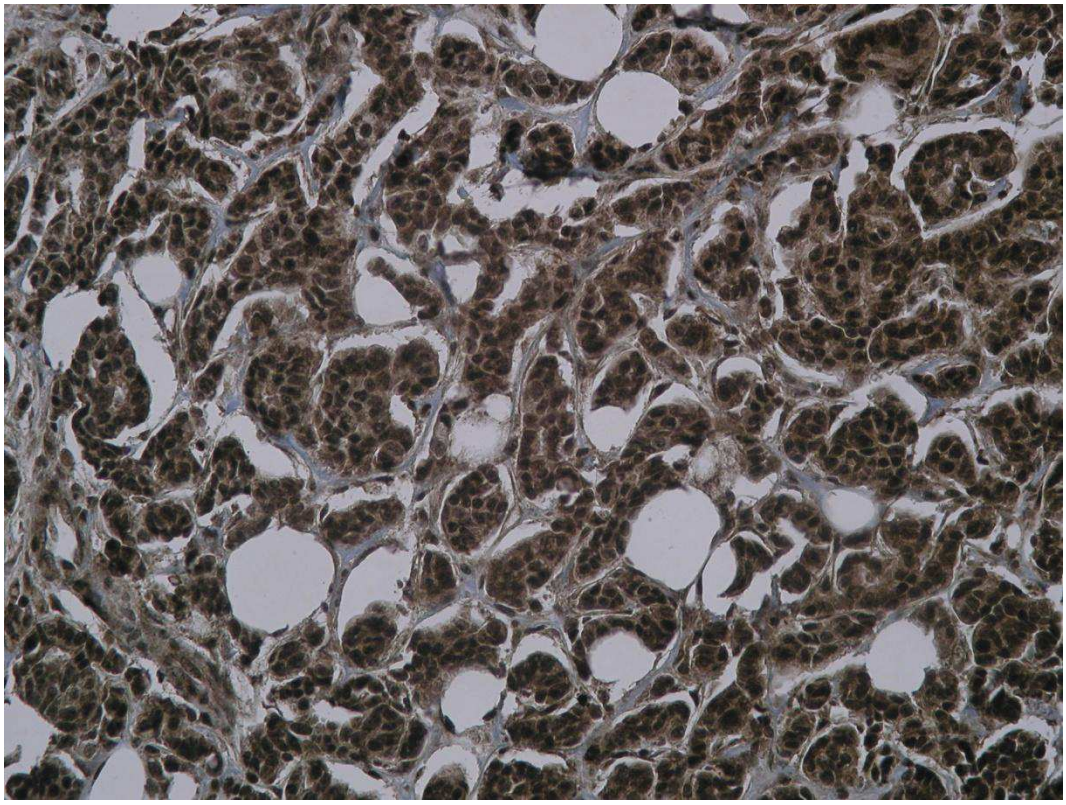
Fot. 4. Ki67, wysoki odczyn proliferacyjny (>14%), powiększenie 20x



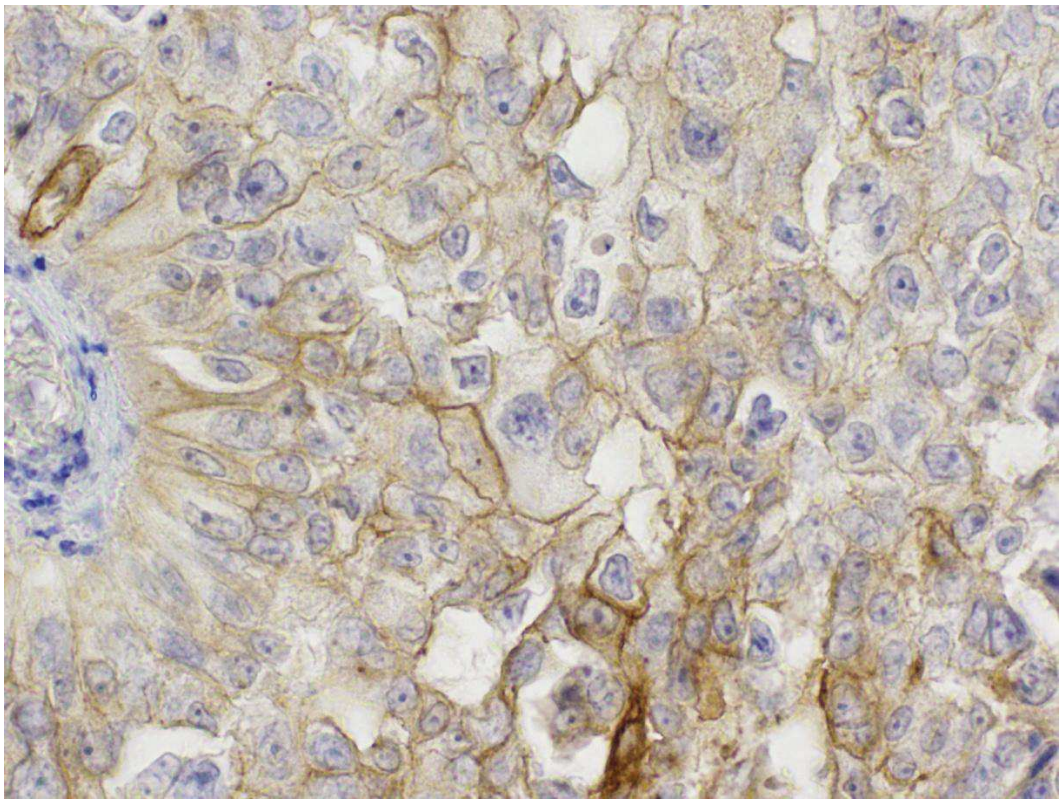
Fot. 5. Dodatni odczyn dla CK5/6, powiększenie 20x



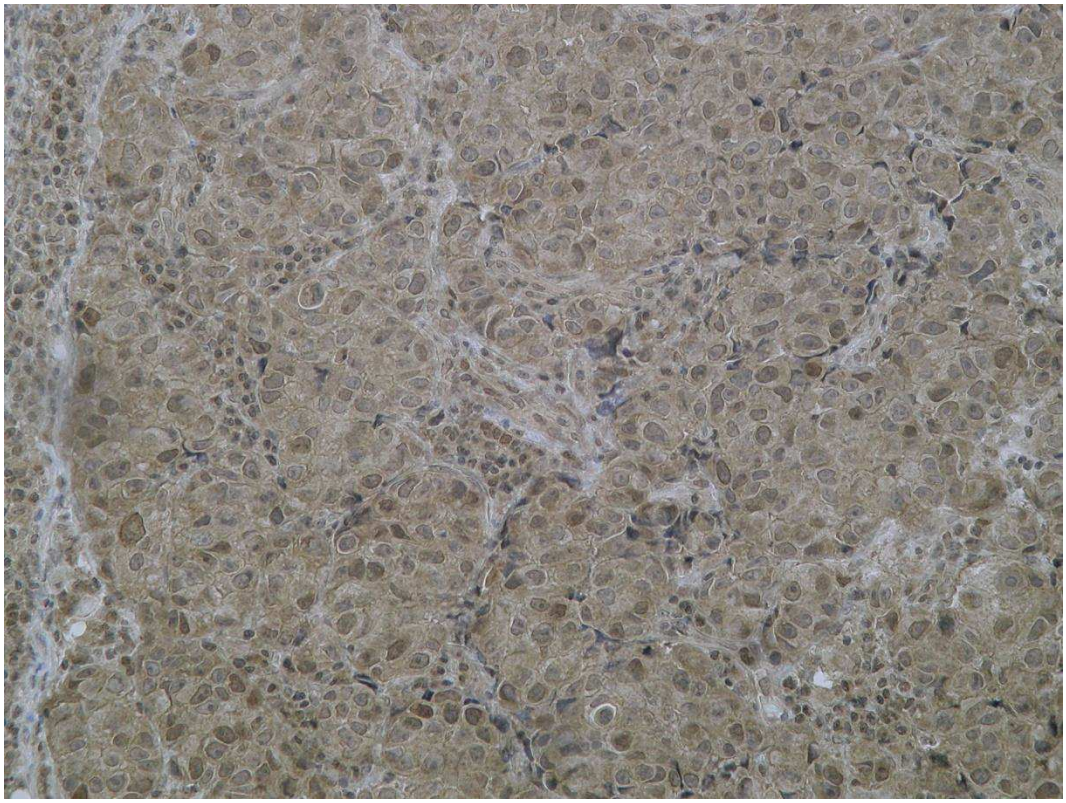
Fot. 6. Dodatni odczyn jądrowo-cytoplazmatyczny dla CXCR4, powiększenie 20x



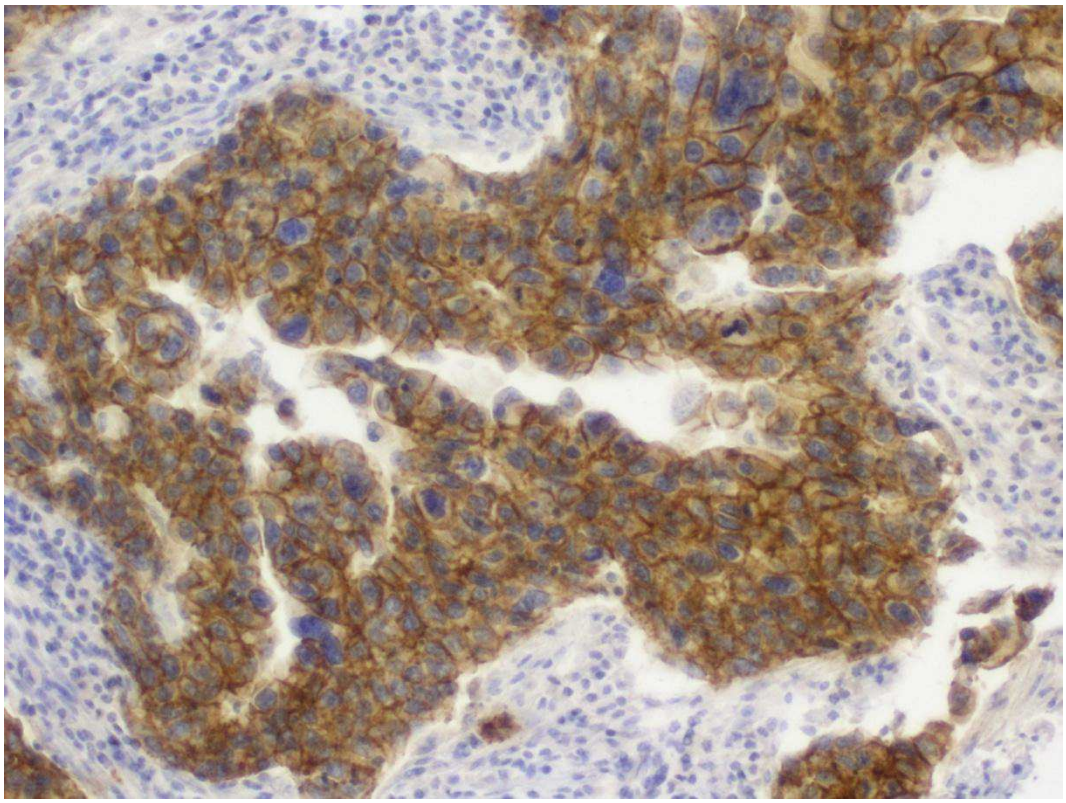
Fot. 7. Dodatni odczyn błonowy dla receptora EGFR, powiększenie 40x



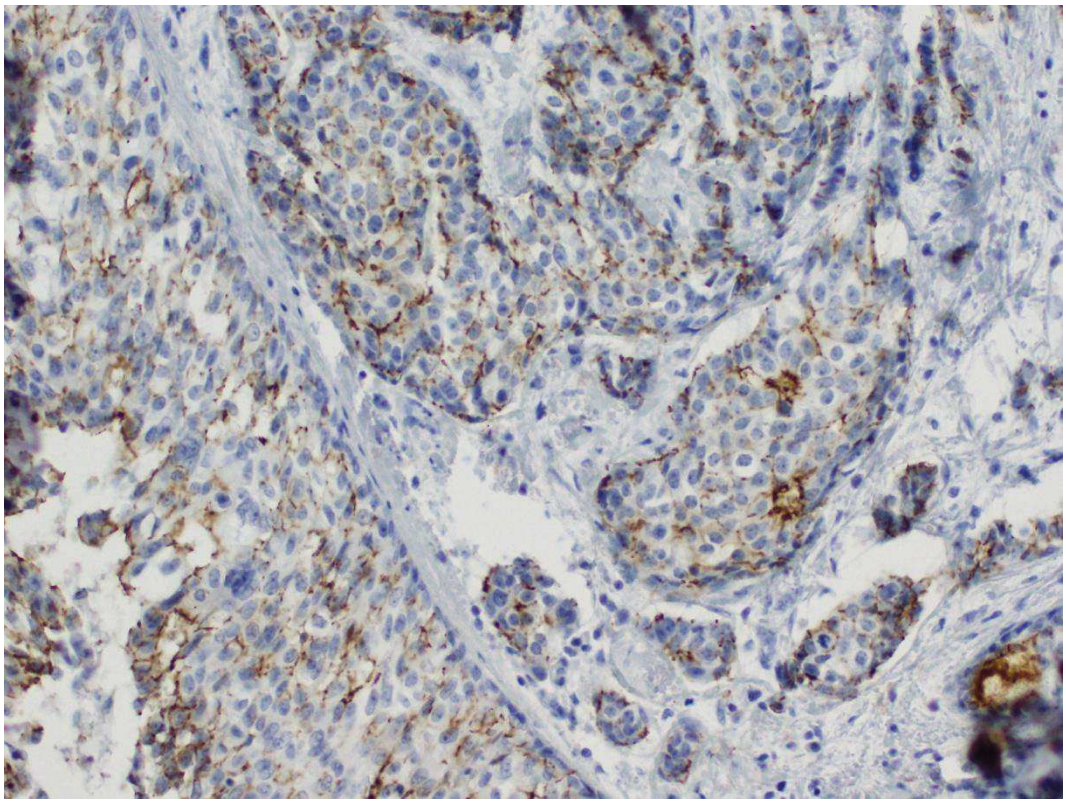
Fot. 8. Dodatni odczyn jądrowy i cytoplazmatyczny dla RAD51 (cytoplazma 100% na 2+, jądro 28% na 2+), powiększenie 20x



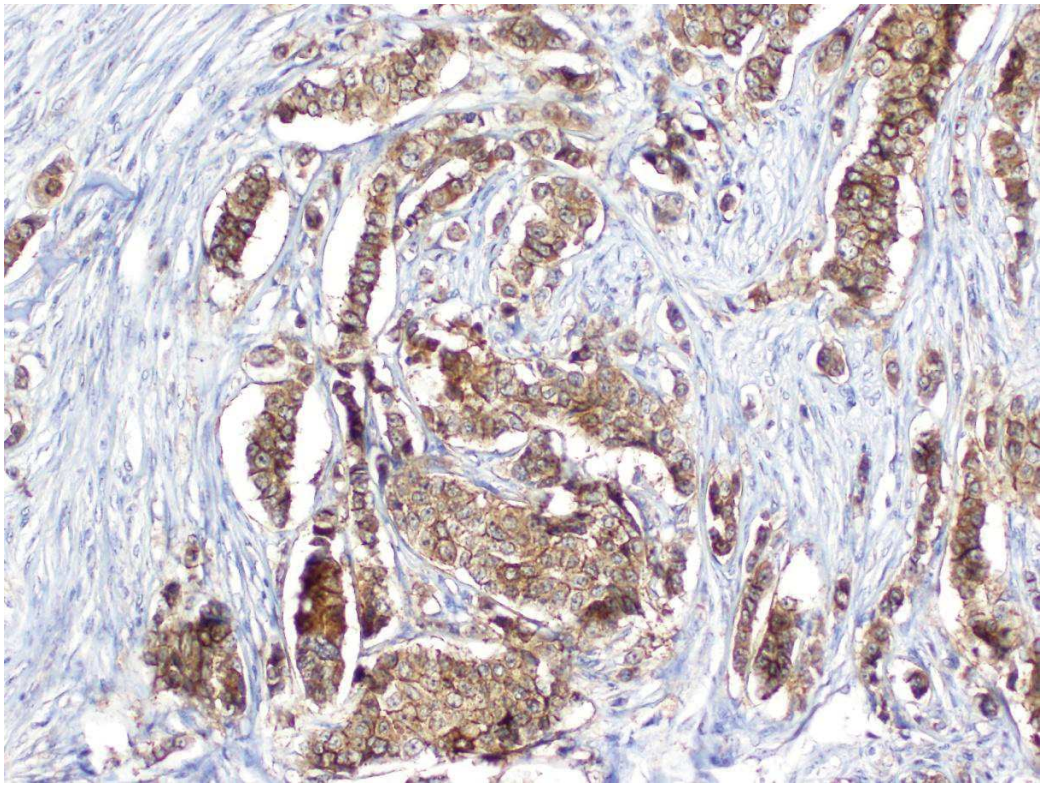
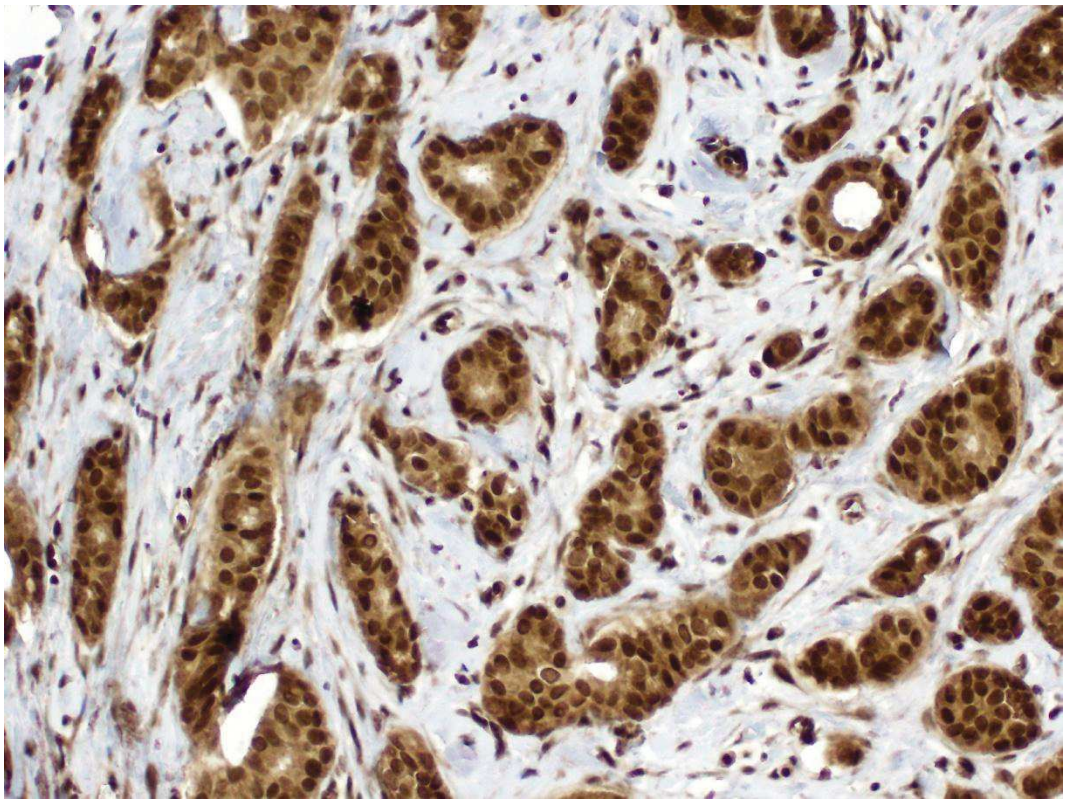
Fot. 9. Dodatni odczyn błonowy dla E-kadheryny, powiększenie 20x



Fot. 10. Słabo dodatni odczyn błonowy (1+) dla klaudyny 3, powiększenie 20x



Fot. 11. Dodatni odczyn błonowy (3+) dla klaudyny 4, powiększenie 20x



Fot. 12 Dodatni odczyn błonowy dla HER3, powiększenie 20x