

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Aleksandra Sejda

*Analiza immunohistochemiczna
i molekularna podjednostki katalitycznej
 $\alpha 3$ -kinazy fosfatydylinozytolu (PIK3CA)
w niedrobnokomórkowym raku płuca*

GDAŃSK 2015

Wydano za zgodą
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Praca doktorska wykonana
w Katedrze i Klinice Onkologii i Radioterapii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor
dr hab. Rafał Dziadziuszko, prof. nadzw. GUMed

Gdański Uniwersytet Medyczny 2015
ISBN 978-83-65098-21-4

Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
1. WSTĘP	7
1.1. Rak płuca – epidemiologia i leczenie	7
1.2. Budowa i funkcje kinazy 3-fosfatydyloinozytolu	8
1.3. Ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu	9
1.4. Podjednostka katalityczna α 3-kinazy fosfatydyloinozytolu a onkogeneza	11
1.5. Amplifikacje i mutacje punktowe PIK3CA w różnych typach nowotworów	12
1.6. Immunohistochemiczna ocena poziomu białka PIK3CA w nowotworach litych	16
1.7. Rola mutacji PIK3CA w oporności na leki	17
1.8. Inhibitory kinazy 3-fosfatydyloinozytolu	18
1.9. Reakcje immunohistochemiczne	19
1.10. Mikromacierze tkankowe	21
1.11. Metody oceny liczby kopii genów	22
1.12. Hybrydyzacja <i>in situ</i>	23
2. CELE PRACY	25
3. MATERIAŁ I METODY	26
3.1. Materiał kliniczny	26
3.2. Przygotowanie mikromacierzy tkankowej	28
3.3. Ocena ekspresji białka PIK3CA	29
3.3.1. Przeciwciało pierwotne PIK3CA	29
3.3.2. Procedura barwienia immunohistochemicznego	29
3.3.3. Histopatologiczna ocena odczynów immunohistochemicznych	30
3.4. Ocena liczby kopii genu PIK3CA	33
3.4.1. Sondy molekularne	33
3.4.2. Procedura hybrydyzacji <i>in situ</i>	35
3.4.3. Analiza liczby kopii genu PIK3CA	36
3.5. Analiza statystyczna	38
4. WYNIKI	39
4.1. Charakterystyka chorych	39

4.2. Immunohistochemiczna ocena ekspresji białka PIK3CA	43
4.3. Analiza liczby kopii genu PIK3CA metodą CISH/SISH	51
4.4. Zależność ekspresji białka PIK3CA od liczby kopii genu PIK3CA	66
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW	70
5.1. Charakterystyka chorych.....	70
5.2. Immunohistochemiczna ocena poziomu białka PIK3CA.....	71
5.3. Liczba kopii genu PIK3CA w NDRP	74
5.4. Zależność ekspresji białka PIK3CA od liczby kopii genu PIK3CA	75
5.5. CISH/SISH jako metoda oceny liczby kopii genu	76
6. WNIOSKI.....	78
7. PIŚMIENNICTWO	79
8. STRESZCZENIE	98
9. SUMMARY	100

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AKT	serynowo-treoninowa kinaza białkowa Akt
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i> / kinaza chłoniaka anaplastycznego
AP	<i>alkaline phosphatase</i> / fosfataza alkaliczna
CEP3	centromer chromosomu 3
CI	<i>confidence interval</i> / zakres ufności
CISH	<i>chromogenic in situ hybridisation</i> / chromogenna hybrydyzacja <i>in situ</i>
cm	centymetr
DAB	3,3'-diaminobenzzydina
DCIS	<i>ductal carcinoma in situ</i> / rak przewodowy przedinwazyjny
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> / kwas deoksyrybonukleinowy
DNP	dinitrofenol
DRP	drobnokomórkowy rak płuca
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> / receptor naskórkowego czynnika wzrostu
FISH	<i>fluorescent in situ hybridisation</i> / fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> / receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu 2
HIER	<i>heat induced epitope retrieval</i> / odsłonięcie epitopu metodą temperaturową
HR	<i>hazard ratio</i> / współczynnik ryzyka względnego w analizie przeżycia
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> / peroksydaza chrzanowa
IHC	immunohistochemia
kDa	kilodalton
kp	tysiąc par zasad
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog</i> / białko KRAS
Mb	milion par zasad
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> / zależna od ligacji multipleksowa amplifikacja
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> / cel rapamycyny w komórkach ssaków
NDRP	niedrobnokomórkowy rak płuca
OS	<i>overall survival</i> / całkowity czas przeżycia
p	współczynnik istotności statystycznej
PBS	<i>phosphatate buffered saline</i> / roztwór buforu fosforanowego
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i> / serynowo-treoninowa kinaza-1 zależna od fosfatydyloinozytolu
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> / kinaza fosfatydylo-3-inozytolu

PIP2	fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan
PIP3	fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trójfosforan
PIK3CA	podjednostka katalityczna α 3-kinazy fosfatydyloinozytoli
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i> / homolog fosfatazy i tensyny
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i> / ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym
r	współczynnik korelacji liniowej Pearsona
RFS	<i>relapse free survival</i> / czas wolny od nawrotu
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / kwas rybonukleinowy
RTK	<i>receptor tyrosine kinase</i> / receptor z aktywnością kinazy tyrozynowej
SISH	<i>silver in situ hybridisation</i> / hybrydyzacja <i>in situ</i> jonami srebra
TKI	<i>tyrosine-kinase inhibitor</i> / inhibitor kinazy tyrozynowej
TMA	<i>tissue microarray</i> / mikromacierz tkankowa
TNM	<i>tumor, nodes, metastases</i> / klasyfikacja guz, węzły, przerzuty

1. WSTĘP

1.1. Rak płuca – epidemiologia i leczenie

Nowotwory złośliwe stanowią drugą po chorobach układu krążenia przyczynę zgonów w Polsce i na świecie. Rak płuca jest najczęściej występującym nowotworem, a także główną przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych. Z danych Krajowego Rejestru Nowotworów wynika, iż w 2012 roku w Polsce spośród ogółu zgonów nowotworowych, 30,7% mężczyzn i 15,3% kobiet zmarło z powodu raka płuca. Standaryzowany współczynnik zachorowalności w 2012 roku na nowotwory złośliwe płuca wśród mężczyzn wynosił $51,2/10^5$, natomiast wśród kobiet $17,8/10^5$ [153]. Około 80% pierwotnych nowotworów złośliwych płuca o pochodzeniu nabłonkowym stanowi niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP). W grupie tej najczęstsze podtypy histologiczne to rak gruczolowy, rak płaskonabłonkowy oraz rak wielkokomórkowy. Pozostałe 20% pierwotnych nowotworów złośliwych płuca stanowi prawie wyłącznie rak drobnokomórkowy (DRP) cechujący się wysokim indeksem proliferacyjnym i znacznym stopniem zaawansowania choroby w momencie jej rozpoznania [32]. Odsetek 5-letnich przeżyć chorych na raka płuca wynosi w Polsce zaledwie około 14%.

Podstawową metodą radykalnego leczenia NDRP jest doszczętna chirurgiczna resekcja guza z odpowiednim marginesem oskrzela i mięszu płuca. Leczenie systemowe oraz radioterapia stosowane są jako terapia neo- lub adjuwantowa, zaś radiochemioterapia jako leczenie radykalne u większości chorych w III stopniu zaawansowania, bądź jako leczenie paliatywne u chorych w stadium rozsiewu choroby. Mediana czasu przeżycia chorych na NDRP waha się od 95 miesięcy dla stopnia zaawansowania IA do 19 miesięcy dla stopnia IIIA [43]. W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój leczenia NDRP w oparciu o nowe schematy chemioterapii oraz nowoczesne techniki radioterapeutyczne. Mimo uzyskania poprawy wyników leczenia, nie przynoszą one jednak przełomu, o czym świadczy nadal bardzo niski odsetek trwałych wyleczeń [110].

Począwszy od drugiej połowy XX wieku, wraz z odkryciem struktury DNA, nastąpił gwałtowny postęp nauk biologicznych, w tym także w dziedzinie onkologii. Zaczęto także podejmować próby praktycznego wykorzystania wiedzy uzyskanej w ramach prowadzenia badań podstawowych (tzw. badania translacyjne), czego owocem było opracowanie nowych strategii terapeutycznych w leczeniu nowotworów złośliwych. Pierwszym lekiem zastosowanym w 2001 roku w ramach leczenia ukierunkowanego molekularnie był imatynib – inhibitor kinazy tyrozynowej (*tyrosine-kinase inhibitor*, TKI) blokujący kinazę Bcr-Abl oraz c-kit, stosowany w leczeniu przewlekłej białaczki szpikowej oraz nowotworów podścieliskowych przewodu pokarmowego (*gastrointestinal stromal tumor*,

GIST) [28]. Kolejnym znaczącym postępowaniem terapeutycznym stało się wprowadzenie trastuzumabu, leku blokującego kinazę tyrozynową receptora naskórkowego czynnika wzrostu HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) – początkowo stosowanego w leczeniu raka piersi, a obecnie także raka żołądka [25, 103]. W raku płuca natomiast pierwszą grupą leków stosowanych w ramach terapii spersonalizowanej stały się inhibitory kinazy tyrozynowej naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) – erlotynib i gefitynib [73]. Ponadto dużym postępowaniem stała się identyfikacja leków hamujących kinazę chłoniaka anaplastycznego (*anaplastic lymphoma kinase*, ALK) [107]. W ostatnich latach zarejestrowano wiele nowych leków celowanych w raku płuca (afatynib, certynib), inne natomiast są na etapie badań klinicznych I – III fazy. Warunkiem zastosowania tych leków jest określenie obecności wiodących zaburzeń molekularnych (np. mutacji *EGFR* lub rearanżacji *ALK*) w komórkach NDRP [108].

Nowe terapie ukierunkowane molekularnie są na chwilę obecną nadzieją na dalszą poprawę wyników leczenia. Jednakże mimo poczynienia znacznych postępów, nasza wiedza w tym zakresie jest wciąż niewystarczająca. Istnieje duża potrzeba poszukiwania i opisywania nowych markerów molekularnych o przewidywalnym znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym.

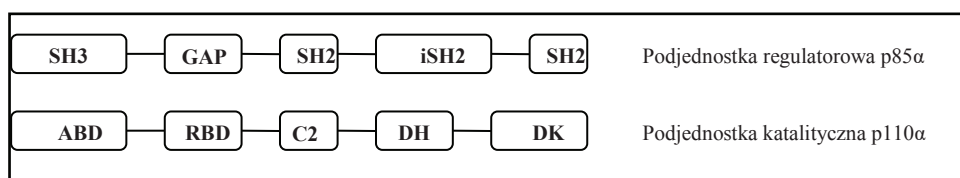
1.2. Budowa i funkcje kinazy 3-fosfatydyloinozytolu

Kinazy fosfatydylo-3-inozytolu (*phosphatidylinositol 3-kinases*, PI3Ks) to grupa enzymów z rodziny kinaz o podwójnej aktywności enzymatycznej: kinazy lipidowej i kinazy białkowej. Enzymy te przeprowadzają reakcję fosforylacji grupy 3-OH pierścienia fosfatydyloinozytolu fosfolipidów błonowych [147]. W zależności od budowy cząsteczki oraz specyficzności względem lipidowego substratu wyróżniamy 3 klasy enzymów PI3K. Głównym substratem dla kinaz klasy I jest fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan (PIP2), którego fosforylacja skutkuje tworzeniem produktu fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trójfosforanu (PIP3). Białka klasy IA to, aktywowane poprzez interakcję z receptorami o aktywności kinaz tyrozynowych (*receptor tyrosine kinases*, RTKs), heterodimery zbudowane z podjednostki regulatorowej 85 kDa (p85) i katalitycznej 110 kDa (p110). Podjednostka katalityczna występuje w 3 izoformach p110 α , p110 β i p110 δ kodowanych odpowiednio przez geny *PIK3CA*, *PIK3CB* i *PIK3CD*. Podobnie wyodrębniono 3 izoformy podjednostki regulatorowej p85 α , p85 β i p85 γ kodowane przez *PIK3R1*, *PIK3R2* i *PIK3R3* [61]. Białka z klasy IB zaś zbudowane są z podjednostki katalitycznej p110 γ oraz regulatorowej p101 lub jej formy homologicznej p84 bądź p87PIKAP. Klasa IB aktywowana jest za pośrednictwem receptorów sprzężonych z białkami G (*G protein-coupled receptor*, GPCR) [21]. Klasa II PI3Ks utworzona jest jedynie przez podjednostkę katalityczną, zawiera-

jącą w swej cząsteczce charakterystyczną domenę C2, a jako substratu używa fosfatydyloinozytolu i fosfatydyloinozytolo-4-fosforanu (PIP). Zasadniczą funkcją białek tej klasy jest regulacja internalizacji receptorów błonowych poprzez interakcje z klatryną. Ponadto kinazy te mogą być także aktywowane przez szereg cytokin, integryn oraz receptorów dla czynników wzrostu, jednakże ich funkcja w odpowiedzi na te specyficzne sygnały nie jest dobrze poznana [37]. Dla klasy III jedynym substratem jest fosfatydyloinozytol. Enzymy tej klasy odpowiadają za aktywność kinazy mTOR (*mammalian target of rapamycin*) w odpowiedzi na zmiany stężenia aminokwasów [61].

O ile stosunkowo niewiele wiemy na temat funkcji pełnionych przez kinazy klasy II i III, o tyle dobrze znany jest fakt, iż w komórkach ssaków klasa IA PI3Ks należy do najistotniejszych enzymów odpowiedzialnych za transdukcję sygnału za pośrednictwem drugiego przekąźnika PIP3 w odpowiedzi na zewnętrzne czynniki stymulujące [37].

Cząsteczka PI3K klasy IA zbudowana jest z podjednostki katalitycznej (p110 α) i regulatorowej (p85 α). Podjednostka p85 α utworzona jest z pięciu domen: domeny SH3, domeny GAP (*GTPase-activating protein homology*), domeny przejściowej inter-SH2 (iSH2), odpowiedzialnej za wiązanie domeny ABD p110 α oraz dwóch domen homologicznych do Src (*Scr homolog 2*, SH2) – domeny N-terminalnej SH2 (nSH2), oraz domeny C-terminalnej SH2 (cSH2). Podobnie jak p85 α podjednostkę katalityczną p110 α tworzy także pięć domen: domena wiążąca białka adaptorowe (*adapter binding domain*, ABD), która odpowiada za wiązanie podjednostki p85 α , domena wiążąca białka Ras (*Ras-binding domain*, RBD), domena C2 oraz domeny – helikalna (DH) i kinazowa (DK) [75].



Rycina 1. Schemat budowy białka PI3K klasy IA

Objaśnienia skrótów w tekście

Figure 1. Structure of PI3K class IA protein

Description of abbreviations in the text

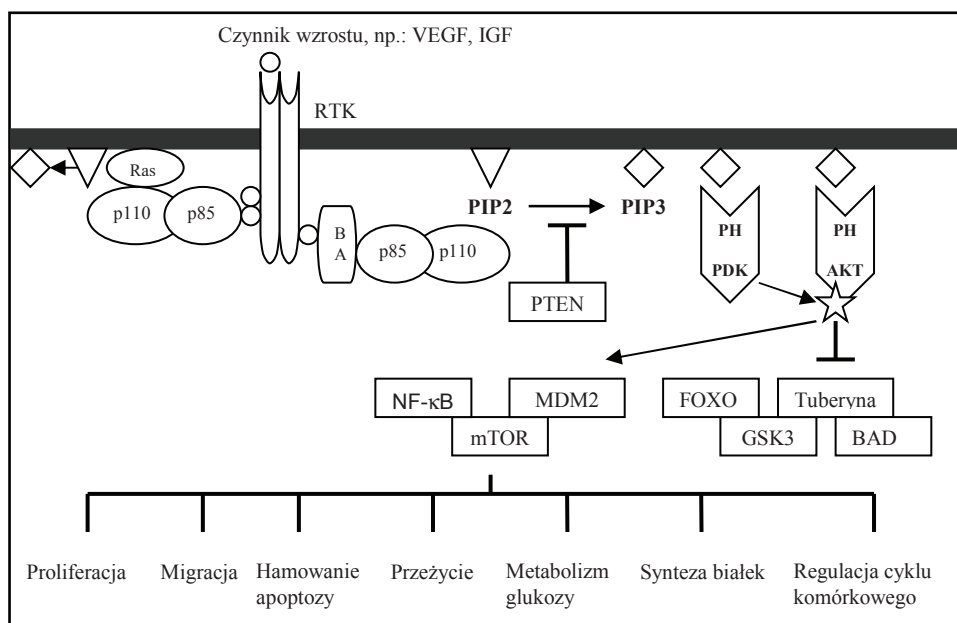
1.3. Ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu

Ścieżka sygnałowa kinazy 3-fosfatydyloinozytolu jest jednym z głównych szlaków przekąźnictwa wewnątrzkomórkowego mającego zasadniczy wpływ na

regulację procesów życiowych komórki [18, 143]. W odpowiedzi na zewnętrzne czynniki stymulujące, w tym głównie czynniki wzrostu, takie jak czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (*platelet-derived growth factor*, PDGF), insulino-podobny czynnik wzrostu (*insulin-like growth factor*, IGF) czy też czynnik wzrostu fibroblastów (*fibroblast growth factor*, FGF) dochodzi do aktywacji odpowiednich receptorów błonowych związanych z aktywnością kinazy tyrozynowej, czego skutkiem jest ich wiązanie, poprzez domeny SH2, z podjednostką regulatorową kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (p85). Umożliwia to heterodimeryzację podjednostki p85 z podjednostką katalityczną p110, co skutkuje aktywacją tej ostatniej [37, 69]. Zasadniczym produktem enzymu PI3K – funkcjonującym jako drugi przekaznik – jest fosfatydyloinozytolotrójfosforan (PIP3) tworzący sieć połączeń z cytoplazmatycznymi białkami sygnalizacyjnymi zawierającymi w swojej części domę homologiczną do domeny plekstryny (*pleckstrin homology*, PH). Należą do nich kinazy tyrozynowe, kinazy serynowo-treoninowe oraz białka G. PIP3 spełnia rolę kotwicy dla nich, umożliwiając ich akumulację w pobliżu błony komórkowej [17, 143]. Tu możliwa jest ich aktywacja poprzez fosforylację z udziałem różnego typu kinaz w tym głównie serynowo-treoninowej kinazy-1 zależnej od fosfatydyloinozytolu (*phosphoinositide-dependent kinase-1*, PDK1). Jednym z głównych białek efektorowych PDK1 jest serynowo-treoninowa kinaza białkowa AKT (znana również jako kinaza proteinowa B, *proteine kinase B*, PKB), dla której substratem są liczne białka mające wpływ na metabolizm, przeżycie, proliferację, wzrost, apoptozę i migracje komórek [139]. Ponadto PDK1 posiada także zdolność aktywacji innych białek, w tym kinazy proteinowej C (*protein kinase C*, PKC), kinazy proteinowej A (*protein kinase A*, PKA) oraz kinazy p70S6c.

Aktywacja PI3K możliwa jest także za pośrednictwem białek z rodziny nie-receptorowych kinaz tyrozynowych (białek Src, Abl) oraz białek Ras poprzez bezpośrednią interakcję z podjednostką p110.

Regulacja stężenia PIP3 odbywa się głównie na drodze jego defosforylacji przez homolog fosfatazy i tensyny (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*, PTEN; *mutated in multiple advanced cancers 1*, MMAC1) oraz fosfatazy polifosforanu inozytolu zawierające domenę SH2 (*Src-homology 2 (SH2)-containing phosphatases*, SHIP1 i SHIP2) [17].



Rycina 2. Schemat ścieżki sygnałowej kinazy 3-fosfatydylinozytolu

BA – białka adaptorowe, BAD – białko proapoptotyczne podrodziny BH3-only, FOXO – czynnik transkrypcyjny O z rodziny forkhead, GSK3 – kinaza syntazy glikogenu 3, MDM2 – białko MDM2, NF- κ B – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B, pozostałe skróty wyjaśnione w tekście

Figure 2. The phosphatidylinositol-3- kinase signaling pathway

BA – adaptor proteins, BAD – Bcl-2-associated death promotor protein, FOXO – fork-head box O, GSK3 – glycogen synthase kinase 3, MDM2 – mouse double minute 2 homolog, NF- κ B – nuclear factor kappa B, other abbreviations described in the text

1.4. Podjednostka katalityczna α 3-kinazy fosfatydylinozytolu a onkogeneza

Wpływ zaburzeń funkcjonowania ścieżki sygnałowej kinazy α 3-fosfatydylinozytolu na inicjację procesów związanych z onkogenezą znany jest od lat 80 XX wieku [23, 128]. Bardzo dobrze znanym zaburzeniem ścieżki PI3K/AKT/mTOR są mutacje inaktywujące (*loss-of-function mutations*) w obrębie genu supresorowego *PTEN* prowadzące do utraty jego funkcji i w konsekwencji aktywacji całego szlaku przekaźnikowego, obserwowane m.in. w komórkach raka endometrium, skóry, gruczołu krokowego oraz nowotworów centralnego układu nerwowego (np. w glejaku wielopostaciowym). Inne znane zaburzenia dotyczą mutacji aktywujących protoonkogen *PIK3CA* oraz amplifikację *AKT* [75].

Badania wykazały, iż nadekspresja *PIK3CA* w liniach komórkowych fibroblastów zarodków kurzych (*chicken embryo fibroblast cells*, CEFs) jest przyczyną transformacji nowotworowej komórek poprzez konstytutywną fosforylację AKT [65]. Ponadto analiza *in vivo* klonów komórek ze zmutowanym genem *PIK3CA* ujawniła wpływ deregulacji ścieżki PI3K na zdolności do migracji oraz zwiększoną inwazyjność komórek nowotworowych [111].

Pierwsze doniesienia na temat występowania mutacji onkogenu *PIK3CA* w komórkach nowotworowych u ludzi zostały opublikowane przez zespół Samuela w 2004 r. Autorzy przeprowadzili analizę sekwencji 8 genów PI3K i 8 genów podobnych do PI3K w szeregu różnych nowotworów oraz odpowiadających im tkankach zdrowych. Badania wykazały istnienie mutacji jedynie w obrębie genu *PIK3CA* – kodującego podjednostkę p110α [112, 114].

Podobnie wykazano obecność amplifikacji regionu chromosomu kodującego *PIK3CA*, jednakże uważa się, iż zwielokrotnienie liczby kopii genu może mieć mniejszy wpływ na onkogeny potencjał *PIK3CA* [114, 120]. Ostatecznie ocena liczby kopii genu *PIK3CA* jest przedmiotem niewielu badań i wymaga wnikliwszej analizy.

Najnowsze publikacje potwierdzają obecność mutacji typu nabycia funkcji (*gain-of-function mutations*) w obrębie genu kodującego podjednostkę regulatorką (*PIK3RI*), jednakże ich wpływ na funkcjonowanie enzymu PI3K pozostaje nie w pełni wyjaśniony [129].

Gen *PIK3CA* długości 34 kb zlokalizowany jest na ramieniu długim chromosomu 3 (3q26.3) i zbudowany jest z 20 egzonów kodujących białko o masie 124 kDa złożone z 1068 aminokwasów [75]. Ponad 96% wszystkich zaobserwowanych w tym genie mutacji stanowią somatyczne mutacje punktowe typu substytucji (wg. catalogue of somatic mutations in cancer [COSMIC]; <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>). Około 80% mutacji występuje w obrębie sekwencji kodującej domeny heliakalne w egzonie 9 – E542K i E545K oraz domenę kinazową w egzonie 20 – H1047. Inne rzadziej występujące mutacje pojawiające się w pozostałych domenach p110α, za wyjątkiem domeny RBD, mają dużo mniejszy wpływ na aktywność kinazy [145].

1.5. Amplifikacje i mutacje punktowe PIK3CA w różnych typach nowotworów

Ocena statusu genu *PIK3CA* w guzach litych to obszar zainteresowania wielu grup badawczych i temat coraz liczniejszych prac z dziedziny onkologii i patologii molekularnej. Największą częstość mutacji *PIK3CA* zanotowano – jak dotąd – w raku piersi, jelita grubego oraz endometrium [113, 114]. Amplifikacje genu *PIK3CA* stwierdzono m.in. w raku płuca (zwłaszcza raku płaskonabłonkowym), żołądka i piersi [11]. W większości doniesień nie wykazano korelacji między występowaniem mutacji a amplifikacji genu *PIK3CA*. Obserwowano

także zmienną zależność cech klinicznych i patologicznych, wartości prognostycznych i predykcyjnych w poszczególnych typach nowotworów złośliwych, w stosunku do obecności powyższych zmian genetycznych. Są to, w większości przypadków, wstępne analizy wymagające dalszej weryfikacji.

W pionierskiej pracy poświęconej badaniu genu *PIK3CA* w komórkach nowotworowych wykryto obecność mutacji w 73 na 234 (32%) przypadków raka jelita grubego, 4 w 15 przypadków glejaka wielopostaciowego (27%), 3 w 12 raka żołądka (25%) oraz zaledwie po jednej mutacji w raku piersi (1/12, 8%) i raku płuca (1/24, 4%) [114]. W tym samym roku ukazała się praca Campell i wsp., w której zbadano 284 przypadki pierwotnego raka jelita grubego, piersi oraz jajnika. Posługując się technikami polimorfizmu konformacji pojedynczych nici DNA (*single-strand conformational polymorphism*, SSCP) i wysokosprawną denaturującą chromatografią cieczową (*denaturing high performance liquid chromatography*, DHPLC) zsekwencjonowano wszystkie 20 egzony kodujące gen *PIK3CA* wykazując obecność mutacji w egzonach 6, 7, 9, 14 i 20, ze znaczną przewagą mutacji w egzonach 9 i 20 (88,9%). Częstość mutacji w raku piersi wynosiła 40% (28/70), raku jelita grubego 18,8% (6/32) i raku jajnika 6,6% (11/167). Ponadto w przytoczonym badaniu analizowano także liczbę kopii genu *PIK3CA* z zastosowaniem metody qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) wykazując amplifikację genu jedynie w raku jajnika (24,6%, 41/167) [16].

Kolejne badania dowiodły, iż mutacje *PIK3CA* występują w około 25-40% przypadków raka piersi i są częstsze w egzonie 20 [26, 45, 52, 64, 101, 109, 124]. Zwiększoną częstość mutacji *PIK3CA* obserwuje się u chorych z pozytywną ekspresją receptorów steroidowych i brakiem amplifikacji genu *HER2* [132]. Pojedyncze prace wskazują na częstsze występowanie mutacji *PIK3CA* w rakach zrazikowych niż w przewodowych [7, 13]. Analiza częstości występowania mutacji osobno w ogniskach czystego raka przewodowego przedinwazyjnego (*ductal carcinoma in situ*, DCIS), ogniskach DCIS w otoczeniu raka inwazyjnego i w samym raku inwazyjnym nie wykazała różnic, co może dowodzić, iż pojawiają się one na wczesnych etapach onkogenezy raka piersi [92]. Z przeprowadzonych metaanaliz wynika, iż mutacje genu *PIK3CA* w raku piersi mogą być wskaźnikiem lepszego rokowania [79, 100].

Amplifikacja genu *PIK3CA* w raku piersi jest zjawiskiem rzadziej występującym niż mutacje. W nielicznych pracach, w których oceniano liczbę kopii genu *PIK3CA* wykazano amplifikacje w około 8-14% przypadków inwazyjnego raka piersi, bez wpływu na czas przeżycia wolny od nawrotu (*relapse free survival*, RFS) [44, 154].

W rakach jelita grubego mutacje *PIK3CA* są stwierdzane w około 10-32% przypadków i w przeciwieństwie do raka piersi nie wykazano ich obecności w zmianach przedinwazyjnych, za wyjątkiem pojedynczych przypadków gruczolaków kosmkowych i kosmkowo-cewkowych [93, 141, 151]. Przeciwnie kształtuje się kwestia amplifikacji genu *PIK3CA*, którą wykazano zarówno w gruczolakach jak i w zmianach inwazyjnych z częstością odpowiednio ok. 25% i 38%. W

tej samej pracy podkreślono jednak, iż brak jest istotnego związku pomiędzy liczbą kopii genu *PIK3CA* a występowaniem mutacji. Podobnie nie znaleziono związku między cechami klinicznymi, patologicznymi a amplifikacją genu, wykazując jednak dłuższy czas przeżycia (*overall survival*, OS) u chorych z amplifikacją genu [59]. Większość autorów uważa, iż obecność mutacji *PIK3CA* jest wskaźnikiem bardziej agresywnego przebiegu choroby, predysponując do szybszego pojawienia się nawrotów miejscowych oraz przerzutów odległych [50, 66, 74, 97, 116]. Niewyjaśniona pozostaje kwestia współistnienia mutacji *PIK3CA* z niestabilnością mikrosatelitarną (*microsatellite instability*, MSI), gdzie występują rozbieżności prezentowanych wyników w zależności od autorów [2, 30, 84, 142].

Ponadto ustalenie roli mutacji *PIK3CA* w raku jelita grubego ważne jest także ze względu na rozwój terapii z zastosowaniem monoklonalnych przeciwciał hamujących receptory EGFR (np. cetuksymab i panitumumab). Jak dotąd obecność mutacji *KRAS* i *NRAS* ma potwierdzoną negatywną wartość predykcyjną u chorych leczonych tymi lekami, co powszechnie wykorzystywane jest w praktyce klinicznej. Wyniki podobnych badań w odniesieniu do *PIK3CA* wykazują, iż podobnie jak *KRAS* może on spełniać rolę w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie inhibitorami EGFR [31, 116]. Warto dodać, iż pojawiły się ciekawe badania wskazujące, że mutacja *PIK3CA* może być czynnikiem predykcyjnym dla zastosowania aspiryny w leczeniu uzupełniającym u chorych po operacji z powodu raka jelita grubego. Przyjmowanie kwasu acetylosalicylowego wiąże się z wydłużeniem całkowitego czasu przeżycia jedynie w przypadkach z wykazaną mutacją genu *PIK3CA* [96].

W innych nowotworach przewodu pokarmowego stwierdzono obecność mutacji i amplifikacji *PIK3CA* w raku żołądka odpowiednio w około 5-10 % i 30-67% przypadkach [15, 71, 121, 142, 156], w raku przełyku natomiast w 7-11% i 25% [3, 83].

Większość prac poświęconych ocenie roli ścieżki sygnałowej PI3K w onkogenezie raka gruczołowego endometrium wskazuje na aktywację ścieżki na drodze współwystępowania mutacji (około 25%) w genach *PTEN* i *PIK3CA*. Mutacje genu *PIK3CA* występują z częstością 15-40%, głównie w egzonie 20 [14, 19, 20, 42, 49, 68, 95, 140], a amplifikacje z częstością około 12% [68, 95]. Ponadto analiza porównawcza częstości występowania mutacji *PIK3CA* w złożonych rozrostach endometrium i w rakach endometrium wykazała, iż podobnie jak w przypadku raka jelita grubego tak i tu w zmianach przedinwazyjnych mutacje właściwie nie występują [49, 68].

Podwyższona liczba kopii genu *PIK3CA* w raku płuca obserwowana jest w 17-30% przypadków, w przeważającej części u mężczyzn, palaczy tytoniu oraz w guzach o morfologii raka płaskonabłonkowego [4, 60, 88, 98, 133, 155]. W pracy Toschi i wsp. podkreślono także, iż obecność amplifikacji *PIK3CA* wiąże się z wyższym odsetkiem 5-letnich przeżyć (52,2% vs. 40,9% u osób z prawidłową liczbą kopii *PIK3CA*) [133]. Mutacje w obrębie genu *PIK3CA* występują

z częstością 1,5-4% i nie wykazano ich związku z cechami klinicznymi chorych czy charakterystyką patologiczną nowotworów [4, 98, 106, 155, 159]. Analiza mutacji przeprowadzona w grupie 1117 przypadków NDRP przez Wang i wsp. wykazała, iż u osób z prawidłową sekwencją genów *EGFR* i *KRAS*, obecność mutacji *PIK3CA* wiąże się z gorszym rokowaniem [70].

Obecność mutacji i amplifikacji *PIK3CA* stwierdzono również w szeregu innych nowotworów złośliwych, w tym w mięsakach oraz w nowotworach układu limfoproliferacyjnego [58, 75, 105].

Tabela 1 przedstawia najważniejsze doniesienia ostatnich lat dotyczące oceny amplifikacji genu *PIK3CA* w litych nowotworach złośliwych, ze szczególnym uwzględnieniem raka płuca.

Tabela 1. Zestawienie najważniejszych doniesień dotyczących oceny liczby kopii genu *PIK3CA* w litych nowotworach złośliwych

Table 1. Studies on PIK3CA gene copy number in solid malignancies

Autor, rok [pozycja piśmiennictwa]	Typ nowotworu	Liczba przypadków	Metoda badawcza	Amplifikacja (%)
Toschi i wsp., 2014 [133]	NDRP	133 SCC 237 ADC 65 inne	FISH	78 (58,7%) 38 (16%) 11 (16,9%)
Wang i wsp., 2014 [149]	NDRP	64 SCC 78 ADC	FISH	23 (38%) 4 (5,1%)
Ji i wsp., 2011 [60]	NDRP	96	qRT-PCR	30 (31,3%)
Angulo i wsp., 2008 [4]	NDRP	33 SCC 34 ADC 5 LCC	FISH	14 (42%) 1 (3%) 1 (20%)
Yamamoto i wsp., 2008 [155]	NDRP	139 SCC 195 ADC 22 inne	qRT-PCR	46 (35,7%) 12 (6,2%) 0 (0%)
Okudela i wsp., 2007 [98]	Rak płuca	28 SCC 74 ADC 6 LCC 3 DRP 4 ADCQ	FISH	12 (42,9%) 7 (9,6%) 1 (16,7%) 1 (33,3%) 0 (0%)
Massion i wsp., 2002 [88]	NDRP	52 SCC 61 ADC	FISH	31 (59,6%) 0 (0%)
Q. Yang i wsp., 2014 [156]	Rak żołądka	113	qRT-PCR	76 (67,3%)
Shi i wsp., 2012 [121]	Rak żołądka	131	qRT-PCR	88 (67%)
Byun i wsp.,	Rak żołądka	55	PCR	17 (30,9%)

Autor, rok [pozycja piś- miennictwa]	Typ nowotworu	Liczba przypadków	Metoda badawcza	Amplifikacja (%)
2003 [15]				
Jehan i wsp., 2009 [59]	Rak jelita grubego	419	FISH	159 (37,9%)
Akagi i wsp., 2009 [3]	Rak przełyku	45	qRT-PCR	12 (26,7%)
Wu i wsp., 2005 [154]	Rak piersi	92	qRT-PCR	8 (8,7%)
Gonzalez- Angulo i wsp., 2013 [44]	Rak piersi	971	MIP	134 (13,8%)
Konopka i wsp., 2010 [68]	Rak trzonu macicy	196	qRT-PCR	24 (12,2%)
Wang i wsp., 2015 [148]	Rak szyjki macicy	90	qRT-PCR	16 (26,7%)
Suda i wsp., 2012 [127]	RPGiS	115	qRT-PCR	37 (32,2%)
Chiosea i wsp., 2013 [24]	RPGiS	21	FISH	4 (20%)

ADC – rak gruczolowy, ADCQ – rak gruczolowopłaskonabłonkowy, DRP – drobnokomórkowy rak płuca, FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*, LCC – rak wielkomórkowy, MIP – (*molecular inversion probe assay*), NDRP – niedrobnokomórkowy rak płuca, PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy, qRT-PCR – ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym, RPGiS – rak płaskonabłonkowy regionu głowy i szyi, SCC – rak płaskonabłonkowy

ADC – adenocarcinoma, ADCQ – adenosquamous carcinoma, DRP – small cell carcinoma, FISH – fluorescent in situ hybridisation, LCC – large cell carcinoma, MIP – molecular inversion probe assay, NDRP – non small cell lung cancer, PCR – polymerase chain reaction, qRT-PCR – quantitative real-time PCR, RPGiS – head and neck squamous cell carcinoma, SCC – squamous cell carcinoma

1.6. Immunohistochemiczna ocena poziomu białka PIK3CA w nowotworach łitych

W stosunkowo nielicznych pracach podjęto próbę immunohistochemicznej oceny ekspresji białka PIK3CA w skrawkach z bloków parafinowych zawierających wycinki z guzów pierwotnych i/lub przerzutowych. Większość z tych analiz wyraźnie wskazuje na możliwość powiązania wysokiej ekspresji białka PIK3CA z amplifikacją, bądź mutacją genu w niektórych typach nowotworów [1, 59, 149]. Praca Zhu i wsp. pokazuje, iż w przerzutach raka jelita grubego

znacząco większa jest ekspresja PIK3CA w porównaniu z guzem pierwotnym [160]. Z kolei Akagi i wsp. udowadniają, iż wysoka ekspresja białka w komórkach raka przełyku ma związek z obecnością przerzutów węzłowych [3]. Podobne wnioski uzyskał Liu i wsp. w pracy poświęconej immunohistochemicznej ocenie ekspresji białka PIK3CA w komórkach pierwotnego oraz przerzutowego raka żołądka [78].

W tabeli 2 zestawiono prace, w których oceniano ekspresję białka PIK3CA z zastosowaniem reakcji immunohistochemicznej.

Tabela 2. Zestawienie doniesień dotyczących immunohistochemicznej oceny ekspresji białka PIK3CA w litych nowotworach złośliwych

Table 2. Studies on PIK3CA immunohistochemical protein expression in solid malignancies

Autor, rok [pozycja piśmiennictwa]	Typ nowotworu	Liczba przypadków	Pozytywne przypadki (%)
Wang i wsp., 2014 [149]	Rak płuca	142	69 (48,6%)
Firoozinia i wsp., 2014 [38]	Rak piersi	50	12 (24%)
Abe i wsp., 2013 [1]	Rak jajnika	62	45 (73%)
Zhu i wsp., 2012 [160]	Pierwotny rak jelita grubego	60	18 (30%)
	Przerzuty	60	28 (46,7%)
Liu i wsp., 2010 [78]	Pierwotny rak żołądka	20	7 (35%)
	Przerzuty	15	10 (67%)
Jehan i wsp., 2009 [59]	Rak jelita grubego	398	235 (59%)
Akagi i wsp., 2009 [3]	Rak przełyku	66	33 (50%)
Woenckhaus i wsp., 2002 [152]	RPGiS	10	9 (90%)
Lin i wsp., 2001 [77]	Rak płuca	80	34 (43%)

RPGiS – rak płaskonabłonkowy regionu głowy i szyi

RPGiS – head and neck squamous cell carcinoma

1.7. Rola mutacji PIK3CA w oporności na leki

Obecnie znanych jest kilkanaście leków ukierunkowanych molekularnie stosowanych głównie u pacjentów w zaawansowanym stadium choroby, jednakże nie wszyscy odnoszą korzyści z leczenia. Dlatego też podejmuje się próby identyfikacji zaburzeń genetycznych mogących mieć wpływ na wykształcenie oporności na leki z tej grupy oraz mogących mieć zastosowanie jako potencjalne czynniki prognostyczne i predykcyjne pozwalające przewidzieć przebieg terapii.

Szereg doniesień sugeruje, iż mutacje aktywujące genu *PIK3CA* oraz utrata aktywacji *PTEN* to zaburzenia genetyczne odgrywające zasadniczą rolę w pierwotnej i nabytej oporności na stosowane obecnie terapie celowane [48].

Badania prowadzone w grupie chorych z rozsiałym rakiem piersi wskazują na związek gorszej odpowiedzi na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej receptora HER2 (trastuzumab, lapatynib) u chorych z zaburzeniami prowadzącym do aktywacji ścieżki PI3K/AKT [22, 41, 150].

Uważa się, iż mutacje genu *PIK3CA* głównie w obrębie kodonu 20 mogą stanowić czynnik predykcyjny braku odpowiedzi na leczenie inhibitorami receptora EGFR (cetuksymab, panitumumab) u chorych z przerzutowym rakiem jelita grubego, szczególnie z jednoczesną prawidłową sekwencją genu *KRAS* [29, 31, 86, 116, 122]. Podobną rolę mogą odgrywać mutacje *PIK3CA* u chorych na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca z mutacją *EGFR*, leczonych drobnocząsteczkowymi inhibitorami kinazy tyrozynowej EGFR (erlotynib, gefitynib) [40, 81].

Należy dodać, iż aktywacja ścieżki sygnałowej PI3K jest także odpowiedzialna za oporność na wiele konwencjonalnych chemioterapeutyków np. doksorubicyny, paklitakselu i 5-fluorouracylu [48].

1.8. Inhibitory kinazy 3-fosfatydyloinozytolu

Cząsteczki białkowe wykazujące aktywność hamującą względem kinazy 3-fosfatydyloinozytolu podzielić można na trzy grupy:

- nieselektywne inhibitory PI3K, które jednocześnie hamują kinazę mTOR (np. GDC-0980, PF-04691502, BEZ235, XL765, GSK2126458);
- inhibitory ukierunkowane przeciwko wszystkim klasom kinazy PI3K, bez aktywności względem kinazy mTOR (np. pictilisib, buparlisib, XL147, PX-866, copanlisib);
- inhibitory poszczególnych izoform kinazy PI3K (np. p110 α – BYL719, INK1117, taselisib; p110 β – GSK-2636771, AZD8186; p110 δ – IPI-145, idelalisib, GDC-0032).

Te ostatnie pozwalają na bardziej selektywną blokadę przy jednoczesnym zminimalizowaniu działań niepożądanych wynikających z hamowania wszystkich izoform enzymu PI3K [11, 157].

Badania prowadzone *in vitro* oraz w modelach zwierzęcych wykazały obecność różnego stopnia efektu hamującego wzrost komórek nowotworowych po podaniu leków ze wszystkich powyżej wymienionych grup inhibitorów PI3K [11, 157]. Amplifikacje oraz mutacje genu *PIK3CA* stanowią potencjalny molekularny czynnik predykcyjny odpowiedzi na leczenie. Jednocześnie jednak podkreśla się możliwy wpływ innych zmian genetycznych, w tym inaktywacji *PTEN* czy amplifikacji *HER2* [94, 123, 130]. Zachęcające wyniki badań przed-

klinicznych zaowocowały wdrożeniem pierwszych badań klinicznych, z których wyciągnięto podobne wnioski [56, 57]. Obecnie prowadzone są badania I i II, a ostatnio także III fazy z udziałem różnych grup inhibitorów szlaku PI3K/AKT/mTOR, zarówno u pacjentów bez wcześniejszej selekcji molekularnej jak i u chorych z ustalonym statusem genu *PIK3CA* (mutacje punktowe i/lub amplifikacja).

Jednym z obiecujących inhibitorów wszystkich izoform PI3K jest PX-866. Badania kliniczne I fazy wykazały, iż jest to jeden z najbezpieczniejszych i najlepiej tolerowanych inhibitorów PI3K. W przeciwieństwie do innych inhibitorów PX-866 nie wykazuje efektów ubocznych w postaci hipoglikemii oraz wysypki. Najczęstszymi działaniami niepożądanymi PX-866 były biegunki i wymioty [54]. Jednakże niedawno opublikowane prace pokazały, iż zastosowanie PX-866 w skojarzeniu z docetakselem u osób z rozsiałym niedrobnokomórkowym rakiem płuca oraz rakiem płaskonabłonkowym rejonu głowy i szyi nie wpływa znacząco na czas przeżycia chorych. Należy dodać, iż leczenie w ramach tego badania odbyło się bez uprzedniej selekcji molekularnej guzów [62, 72].

Innym interesującym nieselektywnym inhibitorem PI3K jest buparlisib (BKM 120), testowany głównie w badaniach klinicznych u chorych z rakiem piersi. U części pacjentów obserwowano kliniczną korzyść z zastosowania buparlisibu [39, 89, 117]. Podobnie aktywność przeciwnowotworową wykazują inne nieselektywne inhibitory PI3K takie jak pictilisib (GDC-0941), czy też SAR245408 (XL147) zarówno u pacjentów z potwierdzoną aktywacją szlaku PI3K jak i u pacjentów, u których nie wykonano analizy pod kątem przypuszczalnych czynników predykcyjnych [10, 115, 118].

Wczesne wyniki badań klinicznych fazy I z zastosowaniem selektywnych inhibitorów p110 α – BYL719 i taselisibu (GDC-0032) wykazały obecność klinicznych korzyści z zastosowania tychże preparatów, szczególnie u pacjentów z potwierdzonymi aberracjami genu *PIK3CA* [157].

Podsumowując, badania nad oceną statusu genu *PIK3CA* są istotne z punktu widzenia możliwego zastosowania ich wyników w celu selekcji chorych do terapii nowotworów złośliwych [63, 87]. Z uwagi na potencjalnie duże znaczenie kliniczne oceny mutacji i amplifikacji genu oraz ekspresji białka PIK3CA konieczne jest wprowadzenie najbardziej wiarygodnych metod ich oceny, względnie łatwych w użyciu i dostępnych w codziennej praktyce [157].

1.9. Reakcje immunohistochemiczne

Immunohistochemia (IHC) to technika pozwalająca na detekcję wybranych białek w tkankach i komórkach z wykorzystaniem swoistych przeciwciał na zasadzie reakcji antygen-przeciwciało. Początki stosowania tej metody sięgają

lat 50. uprzedniego stulecia. Od tego czasu dokonano wielu jej modyfikacji i udoskonaleń, by w formie stosowanej dziś znalazła się wśród najważniejszych metod stosowanych powszechnie w praktyce klinicznej. Obecna diagnostyka patomorfologiczna, w szczególności z zakresu onkologii, w znaczącym stopniu opiera się na badaniach immunohistochemicznych, a współczesny patolog nie wyobraża sobie codziennej pracy bez możliwości ich wykorzystania.

Zasadniczym elementem każdej reakcji immunohistochemicznej jest przeciwciało przeciw określonemu antygenowi będącemu przedmiotem analizy. Przeciwciała poliklonalne stanowią heterogenną mieszaninę, których część zmienna zbudowana jest z różnych epitopów skierowanych przeciwko temu samemu antygenowi, zaś monoklonalne, obecnie częściej wykorzystywane, skierowane są przeciwko tylko jednemu epitopowi danego antygeny, co wpływa na ich dużo większą specyficzność. Aby wykryć w badanej tkance kompleks antygen-przeciwciało stosowano różne metody znakowania przeciwciał. Pierwotnie w tym celu używano znaczników radioaktywnych, ale metoda ta była zbyt kosztowna i niebezpieczna dla zdrowia. Do detekcji reakcji antygen-przeciwciało zaczęto następnie używać barwników (np. fluoresceiny). Obecnie efekt barwny uzyskuje się poprzez związanie przeciwciała z enzymem. W reakcjach immunoenzymatycznych używa się enzymów mających zdolność reagowania z bezbarwnymi substancjami zwanymi chromogenami, dającymi barwne produkty. Najczęściej stosowanym enzymem jest peroksydaza chrzanowa (*horseradish peroxidase*, HRP), a chromogenem 3,3'-diaminobenzzydina (DAB). Peroksydaza chrzanowa to enzym wyizolowany z korzeni chrzanu pospolitego (*Cochlearia armoracia*), który katalizuje reakcję utlenienia różnych związków (w tym przypadku DAB) w obecności nadtlenu wodoru. Oksydacja DAB skutkuje wytworzeniem dającego brązowe zabarwienie produktu, nie rozpuszczalnego w alkoholu i innych rozpuszczalnikach organicznych.

W zależności od przebiegu reakcji wyróżniamy immunohistochemię bezpośrednią oraz pośrednią. W pierwszym przypadku przeciwciało rozpoznające antygen jest sprzęgnięte z barwnikiem bądź enzymem. W drugim przypadku reakcja jest dwuetapowa. Najpierw dochodzi do połączenia antygeny z przeciwciałem pierwotnym swoistym dla tegoż antygeny (np. mysie). Dopiero w drugim etapie stosuje się znakowane przeciwciało wtórne swoiste dla przeciwciała pierwotnego (np. znakowane enzymem przeciwciało królicze skierowane przeciwko pierwotnym przeciwciałom mysim). Taka procedura pozwala na uzyskanie większej czułości reakcji, gdyż z jednym epitopem łączy się jedno przeciwciało pierwotne, a z nim z kolei może wiązać się wiele znakowanych przeciwciał wtórnych zwiększając tym samym intensywność sygnału.

Istnieją różne metody koniugacji znacznika z przeciwciałem wtórnym. Do najpowszechniejszych należy kompleks awidyna-biotyna (ABD), którego zasadniczym ograniczeniem jest możliwość niespecyficznego wiązania awidyny z obecną w tkankach endogenną biotiną. W efekcie obserwujemy wyraźny tzw. „efekt tła”, który w niektórych przypadkach może być przyczyną błędnej inter-

pretacji odczynu. W ostatnich latach rośnie więc zainteresowanie innymi możliwościami koniugacji opartymi na szkieletach polimerowych [146].

Materiał do badań z zastosowaniem IHC stanowią najczęściej bloki parafinowe zawierające wycinki tkankowe. Utrwalanie tkanek w formalinie zmienia konformacje białek, co powoduje także modyfikacje w obrębie epitopów, czyniąc je niedostępnymi dla swoistych przeciwciał. W związku z tym stosuje się różne zabiegi mające na celu tzw. odsłonięcie epitopu (*epitope retrieval*). Efekt taki można uzyskać stosując odpowiednie enzymy proteolityczne (np. proteinaza K, pepsyna). Alternatywnie inkubacja badanych tkanek w wysokiej temperaturze (95-120°C w zależności od zastosowanej aparatury) przywraca białku właściwą konformację (*heat induced epitope retrieval*, HIER) [102].

1.10. Mikromacierze tkankowe

Za prekursora techniki mikromacierzy tkankowych (*tissue microarray*, TMA) uznawany jest Hektor Battifora, który w 1986 roku opisał po raz pierwszy metodę tworzenia jednego bloku parafinowego zawierającego fragmenty kilkunastu różnych nowotworów [8]. Niemal dekadę później grupa Kononena zaprezentowała modyfikację metody stosowaną do dziś [67].

Konstrukcja TMA opiera się na wycinaniu, za pomocą igieł umiejscowionych w specjalnie przystosowanym urządzeniu, kilkumilimetrowych okrągłych cylindrów z pierwotnych bloków parafinowych (zwanych „donorami”) i następnie przenoszenie ich do wtórnego bloku (tzw. „akceptora”), w którym poszczególne cylindry spajane są w jedną całość. W efekcie powstaje jeden blok parafinowy składający się z fragmentów tkanek pochodzących od różnych pacjentów [144]. Zasadniczą zaletą TMA w porównaniu z tradycyjną metodą oceny barwień immunohistochemicznych na całych skrawkach jest ich niski koszt, duża wydajność, utrzymanie podobnych warunków reakcji dla kilkunastu próbek, a także możliwość zbadania wielu tkanek w dużo krótszym czasie. Takie podejście pozwala także na ocenę kilkudziesięciu parametrów w tym samym materiale badanym i tworzenie baz danych porównujących je, co stwarza możliwość lepszego poznania zależności pomiędzy różnymi cechami genotypowymi i fenotypowymi nowotworów [67]. Poza tym stosowanie mikromacierzy tkankowej zmniejsza zużycie tkanki, co ma szczególne znaczenie w odniesieniu do rzadkich zmian patologicznych. Z drugiej strony pobranie małej średnicy rdzenia do badania zmniejsza reprezentatywność próby i może być źródłem błędów wynikających z heterogenności guzów względem różnych antygenów i markerów molekularnych. Mimo pewnych ograniczeń, TMA pozostaje niezwykle cenną metodą stosowaną obecnie powszechnie w badaniach naukowych [144].

1.11. Metody oceny liczby kopii genów

Amplifikacja, czyli powielenie liczby kopii określonego genu, to jeden z wielu typów nieprawidłowości genetycznych odpowiedzialnych za transformację nowotworową komórek lub progresję nowotworu. W niektórych nowotworach, amplifikacja jest istotnym czynnikiem predykcyjnym warunkującym kwalifikację do ukierunkowanej molekularnie terapii przeciwciałem monoklonalnym (np. w raku piersi i żołądka amplifikacja genu *HER2* jest czynnikiem predykcyjnym korzyści klinicznej z zastosowania trastuzumabu). Dlatego też obserwuje się rozwój technik wykorzystywanych do analizy liczby kopii genów, także w kontekście poszukiwania optymalnego testu diagnostycznego.

Jedną z najbardziej podstawowych metod oceny kariotypu jest klasyczna analiza cytogenetyczna w technice prążków GTG. Metoda ta pozwala na jednoczesną ocenę całego genomu, jednakże jej poważnym ograniczeniem jest możliwość wychwycenia zmian strukturalnych chromosomów w zakresie większym niż 5-10 Mb [35].

Najpowszechniej stosowaną metodą w diagnostyce onkologicznej wykorzystywaną do wykrywania amplifikacji genów jest hybrydyzacja *in situ*, której głównym ograniczeniem jest rozdzielczość w zakresie 40-250 kb [82]. Metoda ta szerzej zostanie opisana w kolejnym podrozdziale.

Wśród innych technik wykorzystywanych do oceny liczby kopii genów czołową pozycję zajmuje łańcuchowa reakcja polimerazy (*polimerase chain reaction*, PCR) – ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (*quantitative real-time PCR*, qRT-PCR), różnicowy PCR (*double differential PCR*, ddPCR; *direct double differential PCR*, dddPCR), zależna od ligacji amplifikacja multipleksowa sond molekularnych (*multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA) czy porównawcza hybrydyzacja genomowa (*comparative genomic hybridization*, CGH) lub jej odmiana macierzowa, arrayCGH.

W technice qRT-PCR porównuje się cykle progowe (*threshold cycles*, Ct) pomiędzy sekwencją badaną, a referencyjną zawierającą znane ilości badanej matrycy. W ten sposób uzyskuje się wartość ΔCt , której analiza pozwala wyznaczyć liczbę kopii genu. Zmiany stężenia produktu PCR i wyznaczanie cykli progowych odbywa się na podstawie pomiaru fluorescencji proporcjonalnej do ilości powielonej sekwencji. Fluorescencję uzyskuje się stosując związki fluorescencyjne wiążące się z dwuniciowym DNA (SYBR Green I) lub sondy molekularne wyznakowane fluorochromami (TaqMan, sondy typu Skorpion, *Molecular Beacons*) [125].

Podstawą różnicowego PCR jest możliwość amplifikacji genu badanego o nieznanej liczbie kopii oraz ilościowo określonego referencyjnego genu (geny podstawowego metabolizmu np. dysmutaza nadtlenkowa 2) w jednej mieszaninie reakcyjnej. Porównanie ilości powstałych podczas reakcji PCR produktów pozwala półilościowo ocenić liczbę kopii badanego genu [9].

Technika MLPA polega na zależnej od ligacji multipleksowej amplifikacji sond, gdzie stosuje się odpowiednie zestawy, zbudowanych z dwóch fragmentów, sond hybrydujących do badanego odcinka genomowego DNA. Po hybrydyzacji oba fragmenty ulegają ligacji i służą jako matryca dla polimerazy DNA. Jeden z odcinków znakowany jest fluorescencyjnie co umożliwia detekcję produktu PCR podczas elektroforezy kapilarnej. Wynik dla próby badanej porównywany jest z wynikiem dla prób kontrolnych. Niewątpliwą zaletą metody jest brak konieczności wykorzystywania specjalistycznego sprzętu i stosunkowo niski koszt [126].

Mikromacierze CGH to płytki zawierające klony DNA pokrywające interesujący nas fragment genomu (np. jeden chromosom), bądź cały genom. Jednoczesna i kompetytywna hybrydyzacja wyznakowanych dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi fragmentów DNA badanego i referencyjnego (zmieszanych w stosunku 1:1) pozwala uzyskać mapę intensywności fluorescencji. Na jej podstawie z zastosowaniem specjalistycznego oprogramowania komputerowego można określić zaburzenia liczby kopii genów [80].

Na początku obecnego stulecia rynek biotechnologiczny został zrewolucjonizowany przez technologię znaną jako „głębokie sekwencjonowanie” lub „sekwencjonowanie nowej generacji” (*next generation sequencing*, NGS) otwierającą nowe możliwości w dziedzinie onkologii i patomorfologii molekularnej, w tym także ocenę liczby kopii genu w wysokiej rozdzielczości <10 kb. Obecnie znanych jest kilka metod detekcji liczby kopii genów w oparciu o technikę NGS, których szczegółowy opis przekracza możliwości niniejszego opracowania [33].

1.12. Hybrydyzacja *in situ*

Hybrydyzacja *in situ* to metoda polegająca na łączeniu krótkich fragmentów DNA lub RNA o znanej sekwencji (tzw. sond molekularnych) z materiałem genetycznym zawartym w badanej próbce o sekwencji komplementarnej do sondy. Aby zidentyfikować sondę wykorzystuje się różnego typu znaczniki. Najczęściej w celu detekcji sondy stosuje się znaczniki fluorescencyjne (*fluorescence in situ hybridisation*, FISH). Jednakże technika ta ma zasadnicze ograniczenia, jakimi są dostępność mikroskopu fluorescencyjnego, specjalnie przeszkolonego personelu, ograniczona ocena morfologii badanych jąder komórkowych oraz utrata sygnału fluorescencji po kilku tygodniach, co utrudnia archiwizację badanego materiału [85, 131]. Dlatego też w ostatnich latach podjęto próbę sprzęgania sond molekularnych z innego typu znacznikami. Obecnie poza sondami znakowanymi fluorescencyjnie dostępne są sondy znakowane chromogenami (*chromogenic in situ hybridisation*, CISH), bądź znakowanie metalograficznie np. jonami srebra (*silver-enhanced in situ hybridisation*, SISH). Techniki te umożliwiają określenie liczby kopii badanego genu przy zastosowaniu konwen-

cyjonalnego mikroskopu świetlnego, co znacznie upraszcza badanie i zwiększa jego dostępność, a tym samym przy wykorzystaniu badań w diagnostyce klinicznej pozwala na szybsze uzyskanie wyniku [76]. Ponadto możliwa jest równoczesowa histopatologiczna ocena badanej tkanki, co zmniejsza możliwość pomyłek wynikających z błędnej interpretacji natury jąder komórkowych [55, 76]. Należy dodać, iż dużą zaletą CISH i SISH jest możliwość ich pełnego zautomatyzowania, co pozwala uzyskać jednakowe warunki przeprowadzania reakcji dla wszystkich badanych prób [55, 76]. Kalkulacja kosztów metod FISH i CISH/SISH wypada nieco korzystniej po stronie tych ostatnich [90]. Ponadto w większości prac porównujących wyniki uzyskane metodami FISH i CISH/SISH wskazano wysoki współczynnik zgodności kappa pomiędzy obiema metodami [55, 131]. Wyniki różnych autorów nie zawsze były jednak zbieżne. Ostatnio opublikowana praca Mansfield i wsp. kwestionuje ewentualne korzyści z zastosowania metody dual-ISH (*dual-color in situ hybridisation*) w porównaniu do metody FISH [85]. Jednocześnie podobna praca grupy Lim i wsp. pokazuje zupełnie odmienne spojrzenie na metodę dual-ISH przedstawiając ją jako efektywniejszą [76].

Podsumowując ocena liczby kopii genu w oparciu o hybrydyzację *in situ* z zastosowaniem sond znakowanych chromogenem i/lub jonami srebra stanowi obecnie obiecującą alternatywę dla wciąż jeszcze najszerzej stosowanej metody wykorzystującej sondy fluorescencyjne. Odmienne wyniki prac porównujące specyficzność i czułość obu metod podkreślają konieczność dalszego, wnikliwego ich testowania [27, 76, 85].

2. CELE PRACY

1. Ocena poziomu białka PIK3CA i częstości amplifikacji genu *PIK3CA* w niedrobnokomórkowym raku płuca.
2. Ocena związku cech klinicznych i patologicznych oraz poziomu białka PIK3CA i liczby kopii genu *PIK3CA* w niedrobnokomórkowym raku płuca.
3. Ocena prognostycznego znaczenia poziomu białka PIK3CA i liczby kopii genu *PIK3CA* w niedrobnokomórkowym raku płuca.
4. Ocena związku pomiędzy występowaniem amplifikacji a poziomem białka PIK3CA.
5. Ocena przydatności techniki dual-ISH jako narzędzia diagnostycznego do zastosowania w praktyce klinicznej.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał kliniczny

W badaniu wykorzystano materiał archiwalny pierwotnych niedrobnokomórkowych raków płuca pochodzących od 208 chorych poddanych radykalnemu leczeniu chirurgicznemu w latach 2007-2010 w Klinice i Katedrze Chirurgii Klatki Piersiowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Badanie uzyskało akceptację lokalnej Komisji Bioetycznej (nr zgody NKBBN/288/2013). Średnia wieku chorych w momencie zabiegu operacyjnego wynosiła 62,8 lat. Do oceny pTNM i stopnia zaawansowania klinicznego wykorzystano 7 edycję klasyfikacji TNM Światowej Organizacji Zdrowia [36]. Typ histologiczny oraz stopień zróżnicowania histologicznego (*grading*) oceniono w oparciu o klasyfikację „Guzów płuca, opłucnej, grasicy i serca” wydaną przez Światową Organizację Zdrowia w 2004 [137], którą następnie wznowiono i uzupełniono w 2015 roku [136]. Nacieki opłucnej oceniono wg kryteriów zaproponowanych przez Travis’a i wsp. w 2008 roku [134]. Dla jednego przypadku nie udało się ustalić stopnia naciekania opłucnej ze względu na znaczne rozfragmentowanie guza nadesłanego do oceny patomorfologicznej.

Kliniczną ocenę stopnia zaawansowania przeprowadzono w oparciu o tomografię komputerową klatki piersiowej i nadbrzusza, bronchoskopię oraz ocenę powiększonych węzłów chłonnych śródpiersia za pomocą techniki ultrasonografii wewnątrzoskrzelowej (*endobronchial ultrasound*, EBUS) z pobraniem materiału z węzła chłonnego do analizy cytologicznej. U chorych w II i III stopniu zaawansowania klinicznego rutynowo wykonywano badanie pozytonowej tomografii emisyjnej oraz tomografię komputerową mózgowia. Pozostałe badania diagnostyczne (np. scyntygrafia kości) były zlecane w przypadku objawów klinicznych sugerujących możliwość rozsiewu. U większości chorych potwierdzono rozpoznanie raka płuca przed przystąpieniem do leczenia operacyjnego.

W grupie chorych objętej badaniem najczęstszą wykonaną procedurą chirurgiczną była lobektomia (n=148, 71,2%), następnie pneumonektomia (n=35, 16,8%), bilobektomia (n=13, 6,3%), segmentektomia (n=8, 3,8%) oraz zabiegi resekcji brzeżnej mięszu płuca i mankietowej oskrzela z guzem (n=2, 1%). Najczęstszą lokalizacją nowotworu był płat górny prawy (n=63, 30,3%), nieco rzadziej nowotwór był umiejscowiony w płacie górnym lewym (n=57, 27,4%). Średnica nowotworów oceniona na podstawie badania makroskopowego wahała się w granicach od 1 do 13 cm (mediana 4,0 cm). Odsetek martwicy w tkance nowotworowej wynosił średnio 16,6% (zakres: 0-80%).

Gromadzony materiał pochodził od chorych, którzy wyrazili świadomą zgodę na wykorzystanie materiału biologicznego do badań molekularnych. Wycinki

z guza pierwotnego pobierane były w celu rutynowej oceny histopatologicznej jako elementu procesu diagnostycznego. Po utrwaleniu w 10% zbuforowanym roztworze formaldehydu średnio przez 2 dni, wycinki zatapiano w parafinie. Zabezpieczone w ten sposób tkanki, w postaci bloków parafinowych, przechowywano w temperaturze pokojowej, do momentu przygotowania mikromacierzy tkankowej.

Tabela 3. Stopień zaawansowania patologicznego pTNM wg 7 Edycji WHO

Table 3. pTNM classification according to WHO 7th edition

Cecha T	
Tx	nie można określić wielkości guza pierwotnego
T0	nie stwierdza się obecności guza pierwotnego
Tis	rak przedinwazyjny (<i>in situ</i>)
T1	guz średnicy do 3 cm
1a	guz o największym wymiarze ≤ 2 cm
1b	guz o największym wymiarze > 2 i ≤ 3 cm
T2	guz wykazujący jedną z wymienionych cech: ■ średnica większa niż 3 cm ale nie większa niż 7 cm, ■ zajęcie oskrzela głównego w odległości 2 cm lub więcej (≥ 2 cm) od ostrogi głównej, ■ naciekanie opłucnej płucnej, ■ współistniejąca niedodma lub zapalenie płuca zajmujące okolicę wnęki, ale nie zajmujące całego płuca,
2a	guz o największym wymiarze > 3 i ≤ 5 cm
2b	guz o największym wymiarze > 5 i ≤ 7 cm
T3	guz > 7 cm, naciekający jedną z następujących struktur anatomicznych: ■ ścianę klatki piersiowej, przeponę, nerw przeponowy, opłucną śródpiersiową, osierdzie ścienne lub ■ guz oskrzela głównego umiejscowiony w odległości mniejszej niż 2 cm od ostrogi głównej, lecz bez jej zajęcia lub ■ guz z towarzyszącą niedodmą albo zapaleniem całego płuca, ■ dodatkowy guzek lub guzki nowotworowe w obrębie tego samego płata co ognisko pierwotne

T4	guz każdej wielkości, naciekający co najmniej jedną z podanych okolic: ■ śródpiersie, serce, wielkie naczynia, tchawicę, nerw krtaniowy wsteczny, przełyk, kręgi, ostrogę główną lub ■ dodatkowy guzek lub guzki nowotworowe po tej samej stronie, ale w innych płatach niż ognisko pierwotne
Cecha N	
Nx	węzły chłonne nie możliwe do oceny
N0	brak przerzutów do węzłów chłonnych
N1	obecne przerzuty do węzłów chłonnych okołoskrzelowych i/lub węzkowych po stronie guza pierwotnego (strefy węzłowe 10-14)
N2	obecne przerzuty do węzłów chłonnych śródpiersia po stronie guza pierwotnego i/lub w węzłach rozwidlenia tchawicy (strefy węzłowe 2-9)
N3	obecne przerzuty do węzłów śródpiersia lub węzły po stronie przeciwnej, pod mięśniem pochyłym lub nadobojczykowym po stronie guza pierwotnego albo po stronie przeciwnej
Cecha M	
M0	brak przerzutów odległych
M1	obecne przerzuty odległe
Cecha R	
R0	resekcja doszczętna
R1	resekcja niedoszczętna mikroskopowo
R2	resekcja niedoszczętna makroskopowo

Tabela 4. Ocena mikroskopowa naciekania opłucnej (PL)*Table 4. Microscopic evaluation of pleural invasion (PL)*

PLx	Nie można ustalić zakresu naciekania opłucnej.
PL0	Nie stwierdza się naciekania opłucnej.
PL1	Naciek nowotworowy przekracza blaszkę sprężystą opłucnej płucnej.
PL2	Naciek nowotworowy obejmuje całą grubość opłucnej.
PL3	Naciek nowotworowy obejmuje opłucną ścienną lub zajmuje klatkę piersiową.

3.2. Przygotowanie mikromacierzy tkankowej

Z bloków parafinowych zawierających wycinki z pierwotnych guzów płuca wycięto po cztery rdzenie tkankowe pod kontrolą obrazu mikroskopowego preparatu barwionego standardową metodą hematoksyliny-eozyny, tak aby w każdym cylindrze znalazły się komórki nowotworowe. Nakłucia wykonano przy

użyciu urządzenia Manual Tissue Arrayer MTA 1 (Beecher Instruments Inc, Sun Prairie, USA) igłą średnicy 0,4 milimetra. Korki umieszczono we wtórnym bloku parafinowym, a następnie zgrzano. W ten sposób sporządzono 12 mikromacierzy. Sześć mikromacierzy zawierało wszystkie analizowane przypadki, a 6 kolejnych ich odpowiedniki z wyłączeniem tych przypadków, dla których dostępny był tylko jeden blok (17 przypadków). Do niniejszego badania użyto TMA zawierające cylindry pochodzące od 191 przypadków. Na każdej znalazło się od 14 do 60 przypadków w czterech powtórzeniach oraz po dwie tkanki kontrolne (wątroba) służące do ich prawidłowej orientacji. Wtórne bloki pocięto na mikrotomie na warstwy grubości 4 mikrometry, które następnie umieszczono na szkiełku podstawowym. Tak przygotowane mikromacierze poddano procedurze barwienia immunohistochemicznego, po wcześniejszej 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 38°C oraz procedurze dual-ISH po godzinnej inkubacji w temperaturze 60°C.

3.3. Ocena ekspresji białka PIK3CA

3.3.1. Przeciwciało pierwotne PIK3CA

W celu oceny obecności białka PIK3CA w badanych tkankach zastosowano królicze przeciwciało monoklonalne przeciwko ludzkiej podjednostce p110alfa3-kinazy fosfatydyloinozytolu firmy Cell Signaling o numerze katalogowym #4249 (klon C73F8). Do przeprowadzenia reakcji immunohistochemicznej zastosowano przeciwciało pierwotne w rozcieńczeniu 1:50. Kontrolę pozytywną stanowiła błona śluzowa jelita grubego (wg <http://www.proteinatlas.org>).

3.3.2. Procedura barwienia immunohistochemicznego

Procedurę immunohistochemii pośredniej przeprowadzono zgodnie z protokołem dla zestawu wizualizacyjnego Novolink Polymer Detection System (Novocastra, Wetzlar, Niemcy) w następujących etapach:

1. Deparafinizacja preparatów w szeregu ksilenów (płukanie w wodzie destylowanej przez 3 minuty po każdym z elementów szeregu ksilenowego);

2. Rehydratacja preparatów w malejącym szeregu alkoholi – 100%, 96%, 80%, 70% (płukanie w wodzie destylowanej przez 3 minuty po każdym z elementów szeregu alkoholowego);

3. Odzyskanie antygenowości tj. odsłonięcie epitopów, metodą HIER pod ciśnieniem 120 hPa, w buforze firmy DAKO o pH 6,1. Procedurę przeprowadzono w urządzeniu typu *pressure cooker* przez 1,5 godziny;

4. Chłodzenie TMA w temperaturze pokojowej przez 20-30 minut;

5. Umieszczenie TMA w tzw. komorze wilgotnej do immunohistochemii, składającej się z plastikowego stelażu z umieszczoną na dnie ligniną;

6. Płukanie preparatów roztworem buforu fosforanowego (*phosphate buffered saline*, PBS) przez 3 minuty;

7. Neutralizacja endogennej peroksydazy 3% nadtlenkiem wodoru (*Peroxidase Block RE7101*) przez 3 minuty;

8. Inkubacja z 0,4% fosforanowym roztworem kazeiny (*Protein Block RE7102*) przez 5 minut w celu zmniejszenia możliwości niespecyficznego wiązania przeciwciał pierwotnych;

9. Inkubacja z przeciwciałem pierwotnym w temperaturze pokojowej przez 1,5 godziny;

10. Inkubacja z 10% surowicą zwierzęcą (*Post Primary Block RE7111*) przez 30 minut, w celu wzmocnienia penetracji przeciwciała wtórnego;

11. Inkubacja z przeciwciałem wtórnym (*NovoLink Polimer RE7112*) przez 30 minut;

12. Ekspozycja z 3,3'-diaminobenzydyną (DAB) przez 5 minut;

13. Podbarwianie tkanek heamtoksyliną Mayera przez 5 minut;

14. Dehydratacja preparatów w rosnącym szeregu alkoholowo-ksylenowym (70%, 80%, 96%, 100%);

15. Zamknięcie preparatów balsamem kanadyjskim pod szkiełkiem nakrywkowym.

Po każdym z etapów 7-12 konieczne jest dwukrotne płukanie preparatów w roztworze PBS przez 3 minuty.

Kontrolę ujemną przeprowadzono stosując procedurę barwienia z pominięciem przeciwciał pierwotnych.

3.3.3. Histopatologiczna ocena odczynów immunohistochemicznych

Każdy z czterech cylindrów, reprezentujących dany przypadek, został poddany indywidualnej ocenie ekspresji białka PIK3CA w komórkach nowotworowych przy użyciu mikroskopu optycznego (Olympus BX43). Intensywność odczynu oceniono w czterech kategoriach:

- 0 – brak odczynu;

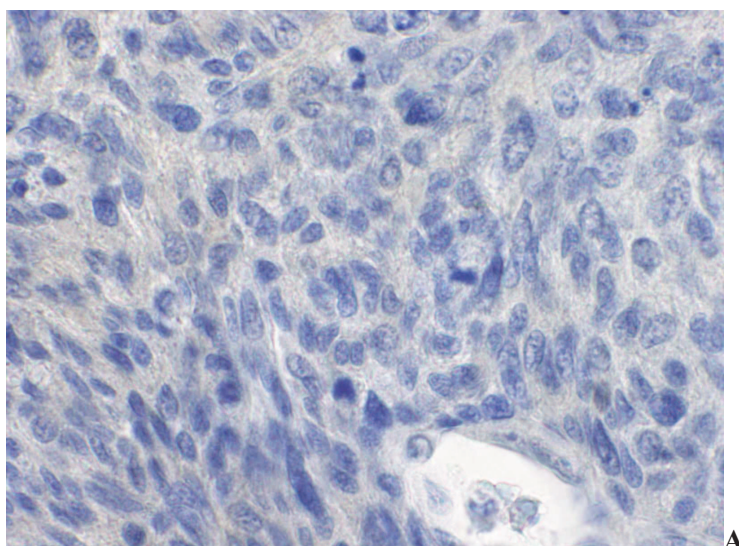
- 1+ – słaby odczyn (jasnobrązowe wybarwienie cytoplazmy widziane w dużym powiększeniu x20-40);
- 2+ – średni odczyn (pomiędzy 1+ a 3+);
- 3+ – silny odczyn (ciemnobrązowe wybarwienie cytoplazmy widziane w małym powiększeniu x5).

Ostateczną analizę przeprowadzono w oparciu o wskaźnik H (*H-score*) wg następującego wzoru:

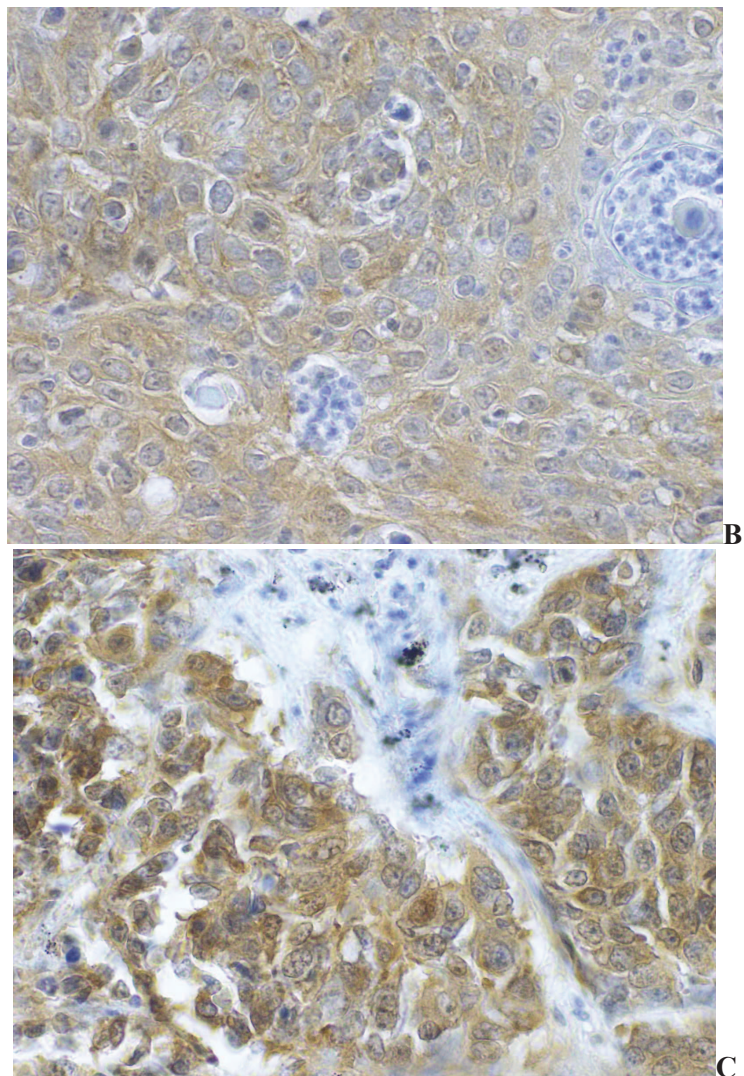
Wskaźnik H (*H-score*) = $1 \cdot P1 + 2 \cdot P2 + 3 \cdot P3$, gdzie

P1 – % komórek o słabym odczynie;
P2 – % komórek o średnim odczynie;
P3 – % komórek o silnym odczynie.

Uzyskano wyniki w zakresie od 0 do 300 dla każdego z badanych cylindrów, gdzie 0 oznacza brak komórek z dodatnią reakcją barwną a 300 wszystkie komórki dodatnie o silnym odczynie [104]. Do oceny statystycznej wzięto pod uwagę wartość maksymalną wskaźnika H uzyskaną ze wszystkich czterech cylindrów reprezentujących dany przypadek. Za punkt odcięcia decydujący o uznaniu danego barwienia immunohistochemicznego za dodatnie przyjęto wartość wskaźnika H ≥ 10 [6, 53, 138]. Rycina 3 przedstawia przykładowe zdjęcia guzów ujemnych oraz dodatnich ocenionych wg wyżej opisanych kryteriów.



A



Rycina 3. Przykładowe wyniki reakcji immunohistochemicznej z zastosowaniem przeciwciała anti-PIK3CA, klon C73F8 (x40)

A – wskaźnik H = 0, B – wskaźnik H = 100, C – wskaźnik H = 200

Figure 3. Representative examples of PIK3CA immunohistochemical staining with the C73F8 antibody (x40)

A – H-score = 0, B – H-score = 100, C – H-score = 200

3.4. Ocena liczby kopii genu *PIK3CA*

3.4.1. Sondy molekularne

W badaniu zastosowano dwa rodzaje sond molekularnych oraz odpowiednich zestawów detekcyjnych (Ventana Medical Systems, Tucson, USA):

- Sonda *PIK3CA* DNP Probe, znakowana dinitrofenolem (DNP), zbudowana z łańcucha 788 kb komplementarnego do fragmentu genu *PIK3CA* na chromosomie 3;
- ultraView SISH DNP Detection Kit – zestaw detekcyjny wykrywający sondy znakowane DNP, składający się z:
 - *ultraView Silver ISH DNP Rabbit anti-DNP Antibody* zawiera królicze przeciwciała monoklonalne wiążące hapten DNP;
 - *ultraView Silver ISH DNP HRP* zawiera peroksydazę chrzanową (HRP) sprzężoną z kozimi przeciwciałami przeciwkróliczymi;
 - *ultraView Silver ISH DNP Chromogen A (Silver A)* zawiera < 1% CH₃COOAg w roztworze wodnym;
 - *ultraView Silver ISH DNP Chromogen B (Silver B)* zawiera < 1% hydrochinonu w roztworze buforu cytrynianowego;
 - *ultraView Silver ISH DNP Chromogen C (Silver C)* zawiera < 0,2% H₂O₂ w roztworze wodnym;

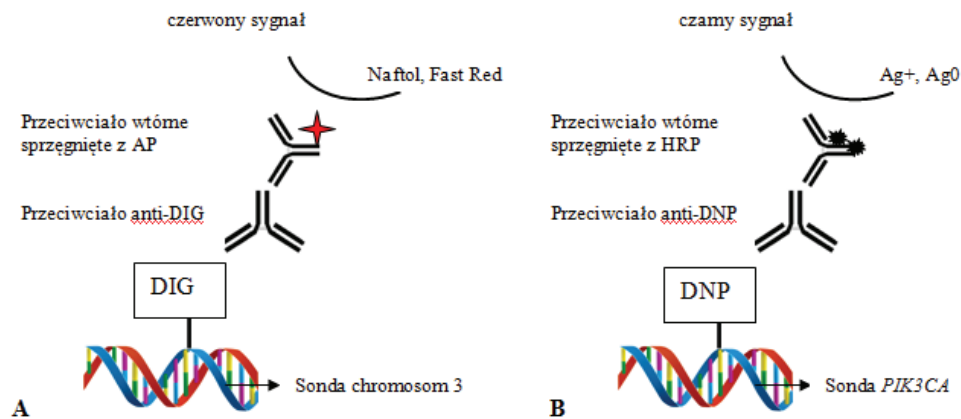
Sonda *PIK3CA* DNP Probe po hybrydyzacji z sekwencją badaną inkubowana jest z króliczym przeciwciałem anti-DNP, a następnie z antykróliczym przeciwciałem drugorzędowym sprzęgniętym z peroksydazą chrzanową (HRP). Uwidaczanie związanych przeciwciał drugorzędowych odbywa się poprzez osadzanie srebra katalizowane przez HRP, czego efektem jest powstanie ziaren srebra. Jony srebra (Ag⁺) z roztworu *Silver A* redukowane są hydrochinonem znajdującym się w roztworze *Silver B* do srebra metalicznego (Ag⁰). Dodanie nadtlenu wodoru (*Silver C*) będącego substratem HRP powoduje wzmocnienie reakcji. Osad srebra odkłada się w jądrach komórkowych, a sekwencja badana widoczna jest w mikroskopie świetlnym jako czarna kropka.

- Sonda Chromosome 3 DIG Probe, znakowana digoksygeniną (DIG), zaprojektowana w sposób umożliwiający jej hybrydyzację z komplementarnym fragmentem centromeru chromosomu 3;

• ultraView Red ISH DIG Detection Kit – zestaw detekcyjny wykrywający sondy znakowane DIG, składający się z:

- *ultraView Red ISH DIG Mouse anti-DIG Antibody* zawiera mysie przeciwciała monoklonalne anti-DIG;
- *ultraView Red ISH DIG AP* zawiera kozie antymysie przeciwciało IgG sprzężone z fosfatazą alkaliczną (*alkaline phosphatase*, AP);
- *ultraView Red ISH DIG pH Enhancer* zawiera <3% MgCl₂;
- *ultraView Red ISH DIG Naphthol* zawiera naftol;
- *ultraView Red ISH DIG Fast Red* zawiera sól Fast Red KL zawieszoną w buforze octanowym;

Sonda *Chromosome 3 DIG Probe* po hybrydyzacji z sekwencją centromeru chromosomu 3 inkubowana jest z mysim przeciwciałem monoklonalnym anti-DIG, które wiążą hapten DIG wbudowany w sondę. Następnie następuje inkubacja z kozim antymysim przeciwciałem wtórnym sprzężonym z enzymem fosfatazą alkaliczną. W celu uwidocznienia przeciwciał drugorzędowych do mieszaniny reakcyjnej dodaje się fosforanu naftolu, który stanowi substrat dla enzymu AP. Naftol w połączeniu z barwnikiem *Fast Red* daje czerwoną reakcję barwną, czego efekt obserwuje się w mikroskopie optycznym, w postaci czerwonej kropki odzwierciedlającej centromer.



Rycina 4. Zasada działania reakcji CISH (A) oraz SISH (B)

Figure 4. Basic principles of CISH (A) and SISH (B)

3.4.2. Procedura hybrydyzacji *in situ*

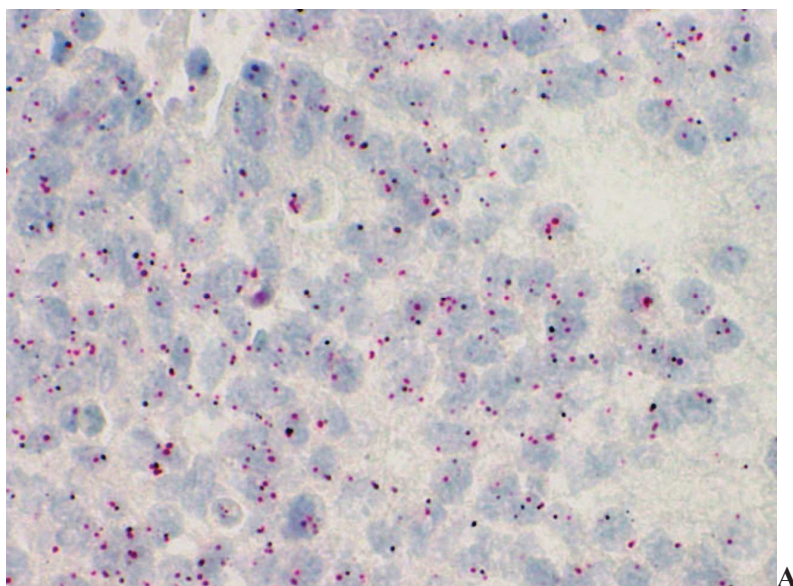
W pełni zautomatyzowaną procedurę hybrydyzacji *in situ* przeprowadzono w urządzeniu BenchMark GX (Ventana Roche, Tucson, USA) wg następującego schematu:

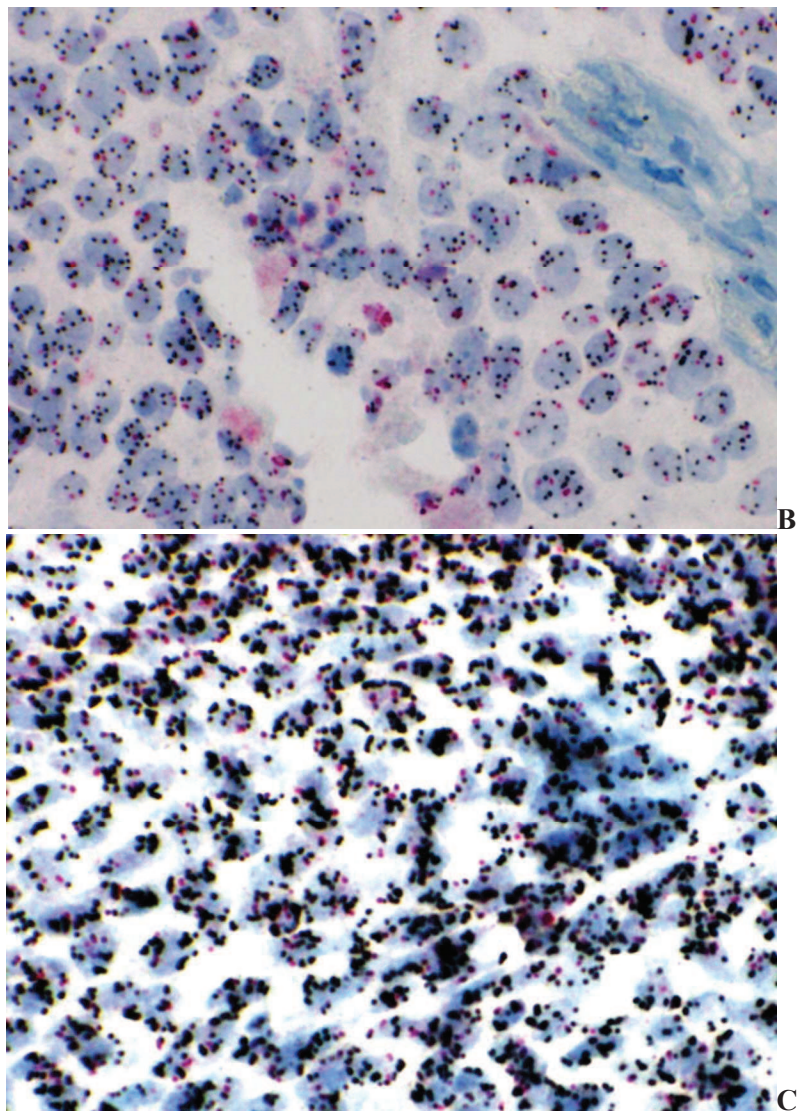
1. Inkubacja preparatów w temperaturze 65°C przez 20 minut;
2. Deparafinizacja (78°C przez 4 minuty);
3. Kondycjonowanie komórek w celu lepszego zachowania ich morfologii z użyciem *Cell Conditioning Reaction Buffer 2* (CC2) w pH=6,0 – 5 cykli ośmiominutowej inkubacji w temperaturze 90°C;
4. Trawienie białek – inkubacja z enzymem proteazą-3 przez 12 minut;
5. Denaturacja DNA (80°C przez 20 minut);
6. Hybrydyzacja z koktajlem sond *PIK3CA DNP Probe* i *Chromosome 3 DIG Probe* (44°C przez 6 godzin);
7. Płukanie preparatów (72°C przez 8 minut w 3 cyklach);
8. Detekcja jonów srebra:
 - inkubacja z roztworem *SIL ISH DNP Rabbit anti-DNP Antibody* przez 20 minut
 - inkubacja z roztworem *SIL DNP HRP* przez 16 minut
 - inkubacja z roztworem *SIL ISH DNP Chromogen A* przez 4 minuty
 - inkubacja z roztworem *SIL ISH DNP Chromogen B* przez 4 minuty
 - inkubacja z roztworem *SIL ISH DNP Chromogen C* przez 16 minut;
9. Detekcja czerwonego sygnału:
 - inkubacja z roztworem *RED ISH DIG Mouse anti-DIG Antibody* przez 20 minut
 - inkubacja z roztworem *RED ISH DIG AP* przez 24 minuty
 - inkubacja z roztworem *RED ISH DIG pH Enhancer* przez 8 minut
 - inkubacja z roztworem *RED ISH DIG Naphthol* przez 4 minuty
 - inkubacja z roztworem *RED ISH DIG Fast Red* przez 8 minut;
10. Kontrastowe wybarwienie preparatów roztworem hematoksyliny II (4 minuty);
11. Procedura po kontrastowym wybarwieniu preparatów roztworem *Bluing Reagent* przez 4 minuty;
12. Aplikacja roztworu LCS (*liquid coverslip*).

Po zakończeniu procedury hybrydyzacji preparaty zostają usunięte z aparatu BenchMark GX i przykryte preparatem *Faramount Aqueous Mounting Medium* (Dako, Glostrup, Dania) pod szkiełkiem nakrywkowym.

3.4.3. Analiza liczby kopii genu *PIK3CA*

Ocenę liczby kopii genu *PIK3CA* wykonano w oparciu o obraz uzyskany pod mikroskopem optycznym w powiększeniu 60x (Olympus BX43), bez znajomości wyników *PIK3CA* IHC. Dla każdego cylindra wykonano analizę w obrębie 50 nienakładających się jąder komórkowych raka. Policzono oddzielnie liczbę kopii genu *PIK3CA*, liczbę centromerów chromosomu 3 (*CEP3*) oraz wyznaczono stosunek liczby kopii genu *PIK3CA* do *CEP3*. Ostateczny wynik dla danego przypadku ustalono na podstawie wartości maksymalnej w/w parametrów uzyskanej z czterech cylindrów. W przypadkach, w których sygnały pochodzące z genu *PIK3CA* były niemożliwe do odseparowania i tworzyły skupienia (*clusters*), dla małych i dużych skupień przypisywano liczbę kopii genu *PIK3CA* równą, odpowiednio 6 i 12 [34]. Amplifikację genu przyjmowano przy stosunku *PIK3CA/CEP3* powyżej dwóch [34, 149]. Rycina 5 przedstawia przykładowe wyniki uzyskanej przez nas hybrydyzacji *in situ* metodą CISH/SISH.





Rycina 5. Przykładowe zdjęcia wyników hybrydyzacji *in situ* CISH/SISH (x60)

Czarne sygnały – *PIK3CA*, czerwone sygnały – centromer chromosomu 3

A – *PIK3CA/CEP3* = 1, B – *PIK3CA/CEP3* = 3,65, C – *PIK3CA/CEP3* = 6,0

Figure 5. Representative examples of chromogenic/silver in situ hybridisation (x60)

Black signals – *PIK3CA*, red signals – chromosome 3 centromere

A – *PIK3CA/CEP3* = 1, B – *PIK3CA/CEP3* = 3.65, C – *PIK3CA/CEP3* = 6.0

3.5. Analiza statystyczna

W celu oceny zależności pomiędzy zmiennymi o rozkładzie typu ciągłego wykorzystano nieparametryczne testy dla prób niezależnych U Manna-Whitney'a oraz Kruskala-Wallisa, a do oceny zmiennych jakościowych test chi-kwadrat. Korelacje pomiędzy dwiema cechami ciągłymi zbadano posługując się metodą Pearsona, wyznaczając współczynnik korelacji liniowej (r).

Posługując się metodą Kaplana-Meiera wyznaczono prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia chorych (*overall survival*, OS) mierząc czas od daty zabiegu do daty zgonu lub daty ostatniej obserwacji. Czas wolny od nawrotu (*relapse free survival*, RFS) zdefiniowano jako czas, który upłynął od daty operacji do daty wznowy, śmierci lub daty ostatniej obserwacji. Jednoczynnikową oraz wieloczynnikową analizę przeżycia wykonano z zastosowaniem testu log-rank oraz modelu proporcjonalnego ryzyka Cox'a. W modelu wieloczynnikowym przyjęto wsteczną eliminację zmiennych na podstawie wyników testu *log-likelihood ratio*.

Wartości współczynników istotności p przyjmowano jako znamienne statystycznie na podstawie poziomu istotności statystycznej $\alpha \leq 0,05$. Wszystkie przeprowadzone testy były obustronne.

Obliczenia statystyczne oraz wykresy wykonano w programie SPSS wersja 22.0 (IBM Corporation, New York, USA).

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka chorych

Dla 197 (94,7%) chorych udało się uzyskać dane dotyczące czasu przeżycia. Średni okres obserwacji chorych żyjących wynosił 6,5 roku (6,5; min.=0,8; max.=9,8 lat). U 22 (10,6%) chorych zanotowano wznowę miejscową, u 34 (16,3%) przerzuty odległe, zaś u 14 (6,7%) zarówno wznowę miejscową jak i rozsiew odległy. Najczęstszą lokalizacją przerzutów odległych był mózg, nadnercza, kości, wątroba i skóra. Osiemdziesięciu dwóch (39,4%) chorych zmarło w trakcie obserwacji.

Dane kliniczne i patologiczne chorych przedstawione są w tabeli 5.

Tabela 5. Cechy kliniczne i patologiczne analizowanej grupy chorych

Table 5. Clinical and pathological patient characteristics

Płeć	
Mężczyzna	140 (67,3%)
Kobieta	68 (32,7%)
Wiek [lata]	
Średnia	62,8
Zakres	40,5-80,5
Typ histologiczny oraz stopień zróżnicowania histologicznego (<i>grading</i>) wg WHO (2004)	
rak płaskonabłonkowy	108 (51,9%)
<i>grade 1</i>	0 (0%)
<i>grade 2</i>	77 (37%)
<i>grade 3</i>	31 (14,9%)
rak gruczołowy	97 (46,6%)
<i>grade 1</i>	11 (5,3%)
<i>grade 2</i>	61 (29,3%)
<i>grade 3</i>	25 (46,6%)
rak wielkokomórkowy	3 (1,4%)
Podtyp histologiczny raka gruczołowego inwazyjnego wg WHO (2015)	
głównie tapetujący	0 (0%)
głównie zrazikowy	58 (27,9%)
głównie brodawkowy	4 (1,9%)
głównie drobnobrodawkowaty	2 (1,0%)

głównie lity	32 (15,4%)
rak śluzotwórczy	1 (0,5%)
Podtyp histologiczny raka gruczołowego inwazyjnego wg WHO (2004)	
typ zrazikowy	53 (25,5%)
typ brodawkowaty	4 (1,9%)
typ lity	21 (10,1%)
typ mieszany	17 (8,2%)
typ śluzotwórczy	1 (0,5%)
typ jasnokomórkowy	1 (0,5%)
Naciek opłucnej	
PLx	1 (0,5%)
PL0	119 (57,2%)
PL1	74 (35,6%)
PL2	3 (1,4%)
PL3	11 (5,3%)
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego wg WHO (2015)	
<i>grade 1</i>	0 (0%)
<i>grade 2</i>	61 (29,3%)
<i>grade 3</i>	36 (17,3%)
TNM	
T1a	20 (9,6%)
T1b	32 (15,4%)
T2a	83 (39,9%)
T2b	38 (18,3%)
T3	34 (16,3%)
T4	1 (0,5%)
N0	127 (61,7%)
N1	48 (23,1%)
N2	31 (14,9%)
N3	0 (0%)
Nx	2 (1%)
Radykalność resekcji	
R0	197 (94,7%)
R1	9 (4,3%)
R2	2 (1%)
Stopień zaawansowania klinicznego	
IA	38 (18,3%)
IB	58 (27,9%)

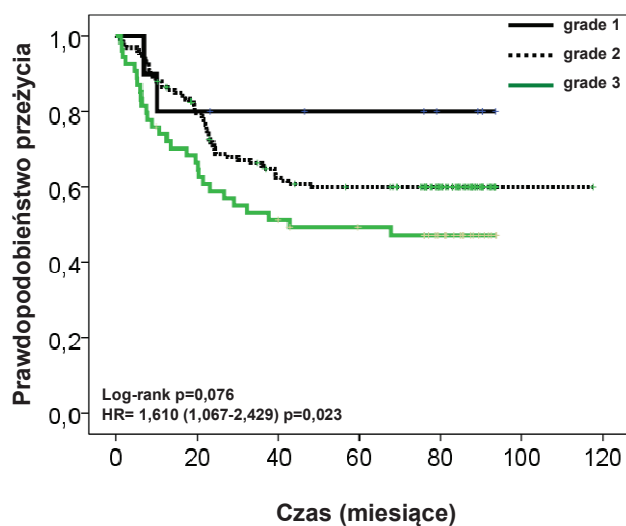
IIA	45 (21,6%)
IIB	28 (13,5%)
IIIA	39 (18,8%)

W analizie jednoczynnikowej, w modelu proporcjonalnego hazardu Cox'a wykazano związek między czasem przeżycia chorych a średnicą guza ($p<0,001$), stopniem naciekania opłucnej ($p=0,001$), stopniem zróżnicowania histologicznego ($p=0,023$), stopniem zaawansowania klinicznego ($p<0,001$) oraz cechą pT ($p=0,012$) i pN ($p<0,001$). Szczegółowe dane na temat analizy przeżycia w zależności od cech klinicznych i patologicznych przedstawia tabela 6.

Tabela 6. Zależność czasu przeżycia od cech klinicznych i patologicznych badanej grupy chorych w regresji jednoczynnikowej ryzyka proporcjonalnego Cox'a

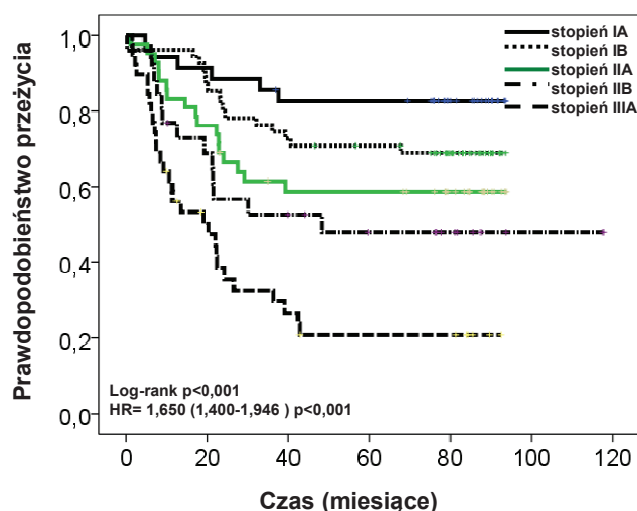
Table 6. Univariate Cox's regression analysis of clinical and pathological patient characteristics for overall survival

Cecha	HR	95% CI	p (model Cox'a)
Wiek [lata]	0,997	0,972-1,022	0,795
Płeć	1,095	0,684-1,753	0,704
Naciek opłucnej	1,523	1,181-1,965	0,001
% martwicy w guzie	0,999	0,987-1,011	0,913
Średnica guza	1,183	1,087-1,288	<0,001
Typ histologiczny wg WHO (2004)	0,880	0,581-1,334	0,547
Podtyp histologiczny raka gruczołowego wg WHO (2004)	1,067	0,888-1,282	0,487
Podtyp histologiczny raka gruczołowego wg WHO (2015)	1,224	0,975-1,536	0,081
Stopień zróżnicowania histologicznego wg WHO (2004)	1,610	1,067-2,429	0,023
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego wg WHO (2015)	1,693	0,877-3,269	0,117
pT	1,169	1,035-1,320	0,012
pN	2,233	1,712-2,911	<0,001
Stopień zaawansowania klinicznego	1,650	1,400-1,946	<0,001



Rycina 6. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od stopnia zróżnicowania histologicznego NDRP

Figure 6. Overall survival probability curves according to NSCLC histological grade

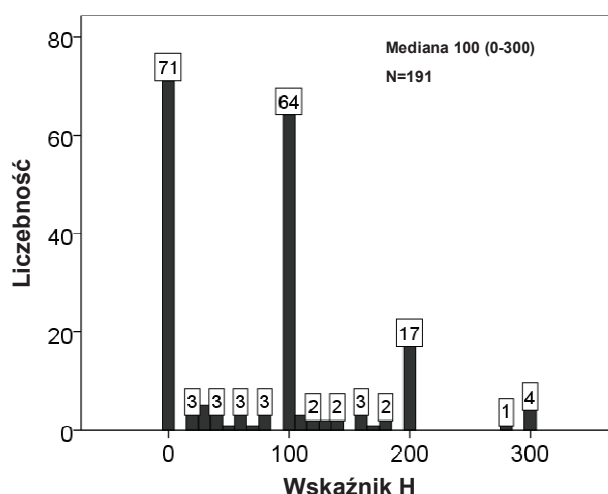


Rycina 7. Prawdopodobieństwo przeżycia chorych w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego

Figure 7. Overall survival probability curves according to patient clinical stage

4.2. Immunohistochemiczna ocena ekspresji białka PIK3CA

Dla 191 (91,8%) przypadków uzyskano wyniki immunohistochemicznej ekspresji białka PIK3CA. Pozostałych 17 przypadków (8,2%) nie objęto analizą, o czym wspomniano w rozdziale poprzednim. W 4 przypadkach (1,9%) odnotowano maksymalną wartość wskaźnika H równą 300. W 71 (34,1%) przypadkach nie wykazano ekspresji białka PIK3CA. Średni wskaźnik H wynosił 74,71, zaś mediana wynosiła 100 (zakres: 0-300). W 120 (62,82%) przypadkach wartość wskaźnika H była większa niż 10. Tak zdefiniowana pozytywna ekspresja białka PIK3CA występowała w 69 przypadkach raka płaskonabłonkowego, w 50 przypadkach raka gruczołowego i jednym przypadku raka wielkomórkowego.



Rycina 8. Histogram przedstawiający rozkład wyników reakcji barwnej PIK3CA

Figure 8. Histogram plots showing distribution of PIK3CA immunohistochemical expression

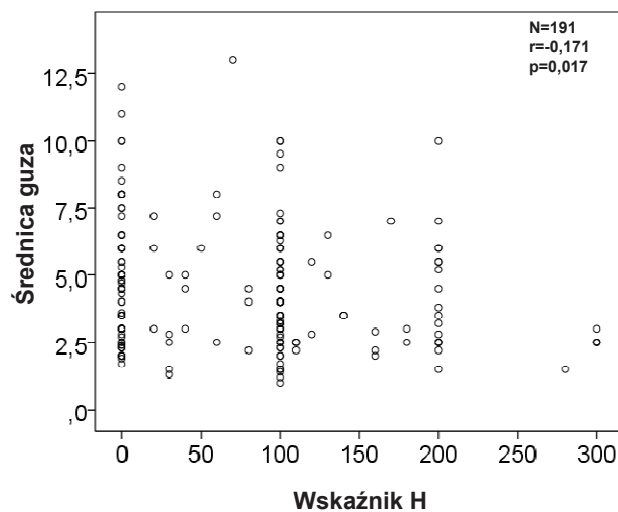
Spośród wszystkich ocenianych cech klinicznych i patologicznych wykazano zależność ekspresji białka PIK3CA, badanej jako cecha ciągła, od podtypu i stopnia zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego ocenianego wg najnowszej klasyfikacji WHO z 2015 roku (odpowiednio, $p=0,034$, $p=0,003$). Wykazano także, że wraz ze wzrostem średnicy guza maleje wskaźnik H (rycina 9). Tabela 7 przedstawia szczegółowe wyniki zależności cech klinicznych i patologicznych od wskaźnika H PIK3CA.

Tabela 7. Zależność immunohistochemicznej ekspresji białka PIK3CA (wskaźnik H) od cech klinicznych i patologicznych

Table 7. PIK3CA protein expression (H-score) versus clinical and pathological patient characteristics

Cecha	p	r
Wiek [lata]	0,999	0,0
Płeć	0,629	
Naciek opłucnej	0,684	

% martwicy w guzie	0,981	-0,002
Średnica guza	0,017	-0,171
Typ histologiczny wg WHO (2004)	0,075	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego wg WHO (2004)	0,569	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego wg WHO (2015)	0,034	
Stopień zróżnicowania histologicznego wg WHO (2004)	0,886	
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego wg WHO (2015)	0,003	
pT	0,120	
pN	0,695	
Stopień zaawansowania klinicznego	0,616	



Rycina 9. Wykres rozrzutu przedstawiający zależność ekspresji białka PIK3CA (wskaźnik H) od średnicy guza pierwotnego

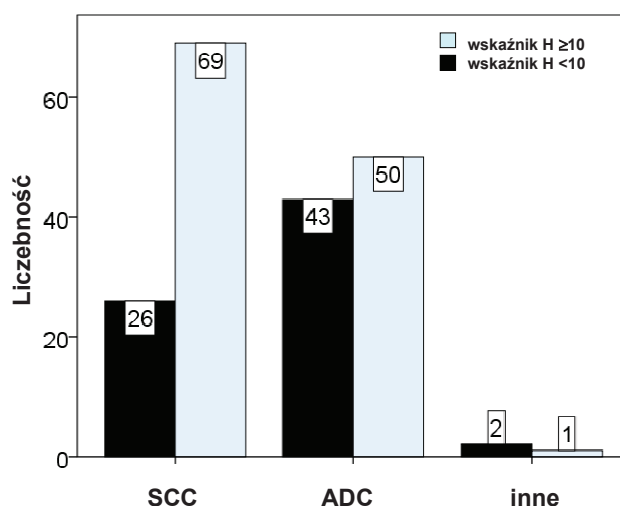
Figure 9. Scatterplot of PIK3CA H-score according to tumor diameter

Przyjmując za punkt odcięcia wskaźnika $H \geq 10$ wykazano, iż białko PIK3CA występuje statystycznie częściej w raku płaskonabłonkowym (rycina 10, $p=0,016$). Ponadto analizując wskaźnik H z punktem odcięcia powyżej 10 wykazano zależność poziomu białka PIK3CA od średnicy guza ($p=0,037$) oraz podtypu i stopnia zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego ocenianego wg najnowszej klasyfikacji WHO z 2015 roku (odpowiednio, $p=0,048$, $p=0,013$). Tabela 8 przedstawia szczegółowe dane dotyczące zależności cech klinicznych i patologicznych od poziomu białka PIK3CA.

Tabela 8. Zależność poziomu białka PIK3CA od cech klinicznych i patologicznych
Table 8. PIK3CA protein expression versus clinical and pathological patient characteristics

Cecha	Brak ekspresji Wskaźnik H < 10	Ekspresja obecna Wskaźnik H ≥10	p
Wiek [lata]			0,448
Płeć			
mężczyźni	48	78	0,713
kobiety	23	42	
Naciek opłucnej			
PLx	0	1	0,929
PL0	38	67	
PL1	28	44	
PL2	1	1	
PL3	4	7	
% martwicy w guzie			0,974
Średnica guza			0,037
Typ histologiczny wg WHO 2004			
rak płaskonabłonkowy	26	69	0,016
rak gruczołowy	43	50	
rak wielkomórkowy	2	1	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego inwazyjnego wg WHO (2004)			
typ zrazikowy	21	29	0,749
typ brodawkowaty	3	1	
typ lity	11	9	
typ mieszany	7	10	
typ śluzotwórczy	1	0	
typ jasnomórkowy	0	1	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego inwazyjnego wg WHO (2015)			
głównie tapetujący	0	0	0,048
głównie zrazikowy	19	36	
głównie brodawkowaty	3	1	
głównie drobnobrodawko-	2	0	

waty głównie lity rak śluzotwórczy	18 1	13 0	
Stopień zróżnicowania histologicznego wg WHO (2004)			
grade 1	4	7	0,969
grade 2	48	79	
grade 3	19	34	
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego inwazyjnego wg WHO (2015)			
grade 1	0	0	0,013
grade 2	21	37	
grade 3	22	13	
pT			
1a	6	11	0,424
1b	12	19	
2a	24	39	
2b	12	25	
3	16	16	
4	1	0	
pN			
x	0	0	0,429
0	45	68	
1	13	32	
2	12	19	
Stopień zaawansowania klinicznego			
IA	12	22	0,308
IB	22	28	
IIA	10	32	
IIB	11	16	
IIIA	16	22	



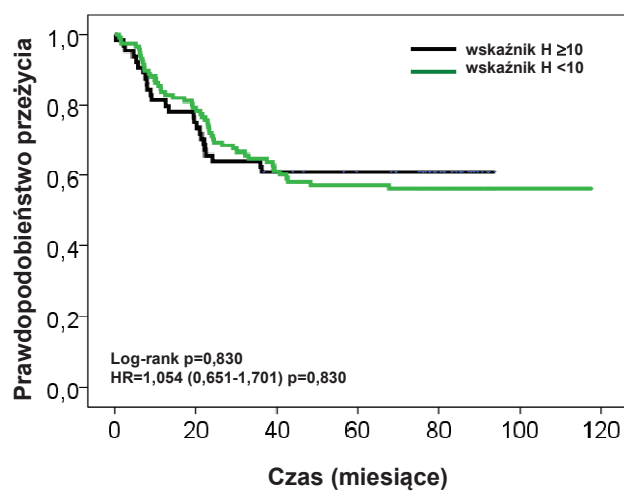
Rycina 10. Wykres przedstawiający zależność poziomu białka PIK3CA od typu histologicznego NDRP

SCC – rak płaskonabłonkowy, ADC – rak gruczołowy

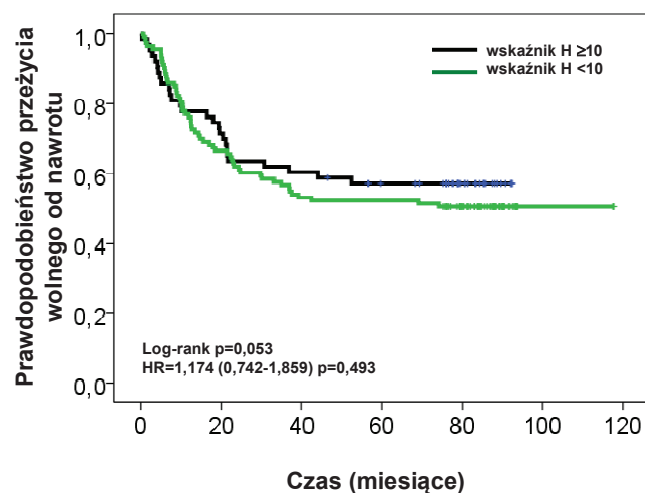
Figure 10. Histogram plot of PIK3CA protein expression according to NSCLC histological type

SCC – squamous cell carcinoma, ADC – adenocarcinoma

W analizie jednoczynnikowej ekspresja białka PIK3CA mierzona wskaźnikiem H, traktowanym jako cecha ciągła, nie miała związku z czasem przeżycia (HR=1,001; 95% CI, 0,998-1,004; p=0,382) oraz czasem przeżycia wolnego od nawrotu (HR=1,002; 95% CI, 0,999-1,005; p=0,188). Nie zaobserwowano także żadnych różnic w OS i RFS w stosunku do poziomu białka PIK3CA przy wartości punktu odcięcia wskaźnika H ≥10 (rycina 11).



A



B

Rycina 11. Prawdopodobieństwo przeżycia (A) i czasu wolnego od nawrotu (B) w zależności od poziomu białka PIK3CA

Figure 11. Overall survival (A) and relapse free survival (B) probability curves according to PIK3CA protein expression

W analizie wieloczynnikowej nie wykazano wpływu ekspresji białka PIK3CA mierzonej jako cecha ciągła jak i z punktem odcięcia wskaźnika $H \geq 10$ na czas przeżycia i czas wolny od nawrotu (tabela 9). W krokowej wstecznej eliminacji zmiennych wskaźnik H został odrzucony z modelu ostatecznego.

Tabela 9. Wieloczynnikowy model regresji ryzyka proporcjonalnego Cox'a czasu przeżycia i czasu wolnego od nawrotu w zależności od poziomu białka PIK3CA (model A) i ekspresji białka PIK3CA z punktem odcięcia ≥ 10 (model B)

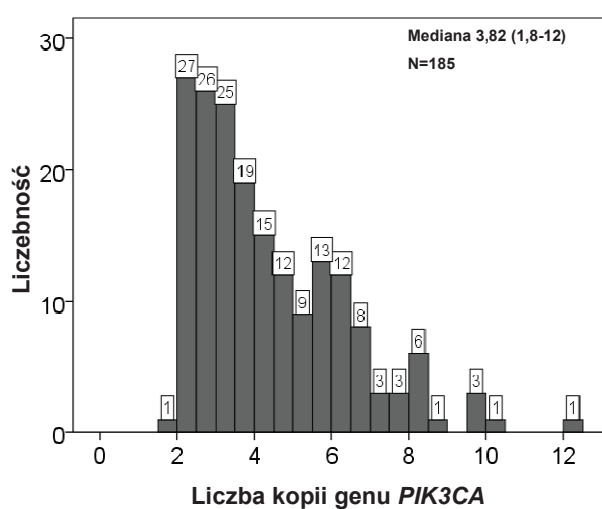
Table 9. Multivariate Cox's regression analysis of PIK3CA protein expression (A) and PIK3CA H-score using 10 as cutoff point (B) for overall survival and relapse free survival adjusting for clinical and pathological patient characteristics

Cecha	OS			RFS		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Model A						
Wiek [lata]	1,001	0,974-1,029	0,944	0,991	0,965-1,016	0,470
Płeć	1,054	0,642-1,731	0,834	1,082	0,678-1,727	0,740
Stopień zróżnicowania histologicznego wg WHO (2004)	1,142	0,718-1,816	0,575	0,989	0,634-1,544	0,962
Stopień zaawansowania klinicznego	1,679	1,396-2,019	<0,001	1,804	1,513-2,151	<0,001
PIK3CA wskaźnik H (cecha ciągła)	1,001	0,998-1,004	0,455	1,002	0,999-1,004	0,179
Model B						
Wiek [lata]	1,001	0,974-1,029	0,925	0,990	0,965-1,016	0,457
Płeć	1,060	0,646-1,739	0,818	1,097	0,687-1,749	0,699
Stopień zróżnicowania histologicznego wg WHO (2004)	1,120	0,709-1,770	0,626	0,965	0,623-1,494	0,872
Stopień zaawansowania klinicznego	1,696	1,410-2,040	<0,001	1,839	1,539-2,196	<0,001
PIK3CA wskaźnik H ≥ 10	1,174	0,720-1,915	0,521	1,412	0,881-2,263	0,152

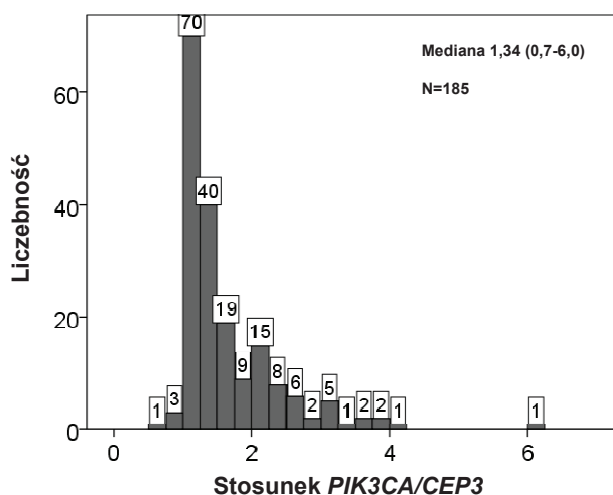
4.3. Analiza liczby kopii genu *PIK3CA* metodą CISH/SISH

Dla 185 (88,9%) badanych przypadków uzyskano dane dotyczące liczby kopii genu *PIK3CA*. Siedemnastu przypadków, podobnie jak w przypadku immunohistochemii, nie objęto analizą. W dwóch przypadkach wszystkie cztery cylindry reprezentujące dany przypadek zostały stracone z TMA, w jednym przy-

padku na żadnym z cylindrów nie znaleziono komórek raka, a w trzech pozostałych nie uzyskano wiarygodnych sygnałów zarówno z centromeru jak i z genu *PIK3CA*. Maksymalna liczba kopii genu wynosiła 12, a minimalna 1,8, zaś maksymalny stosunek *PIK3CA/CEP3* wynosił 6, a minimalny 0,7. W czterech (2,2%) przypadkach stosunek liczby kopii genu *PIK3CA/CEP3* był mniejszy od 1. Rycina 12 przedstawia rozkład liczby kopii genu oraz stosunku *PIK3CA/CEP3* w badanej populacji chorych na NDRP.



A



B

Rycina 12. Histogramy przedstawiające rozkład liczby kopii genu *PIK3CA* (A) oraz stosunku *PIK3CA/CEP3* (B)

Figure 12. Histogram plots showing distribution of PIK3CA gene copy number (A) and PIK3CA/CEP3 ratio (B)

Wykazano, iż rak płaskonabłonkowy niskozróżnicowany (*grade 3*) występuje częściej w guzach wykazujących wyższy stosunek *PIK3CA/CEP3* (odpowiednio, $p < 0,001$, $p < 0,001$) oraz wyższą liczbę kopii genu *PIK3CA* (odpowiednio, $p < 0,001$, $p = 0,003$) badając obie cechy jako zmienne ciągłe (rycina 13 i 14). Podobnie odsetek martwicy w guzie jest wyższy w guzach z wyższym stosunkiem *PIK3CA/CEP3* oraz wyższą liczbą kopii genu *PIK3CA* (odpowiednio, $p < 0,001$, $p < 0,001$). Podtyp histologiczny raka gruczołowego oceniany wg kryteriów WHO z 2004 roku wykazuje słaby związek ze stosunkiem *PIK3CA/CEP3* ($p = 0,043$), nie wykazując jednocześnie związku z liczbą kopii genu *PIK3CA*. Odwrotną zależność zaobserwowano biorąc pod uwagę podtyp histologiczny raka gruczołowego wg najnowszych kryteriów WHO z 2015 roku ($p = 0,039$). Ponadto istnieje zależność między stopniem zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego wg WHO 2015 a liczbą kopii genu *PIK3CA* ($p = 0,029$).

Nie znaleziono istotnych statystycznie różnic pomiędzy wiekiem pacjentów, naciekiem opłucnej, średnicą guza oraz stopniem zaawansowania klinicznego i

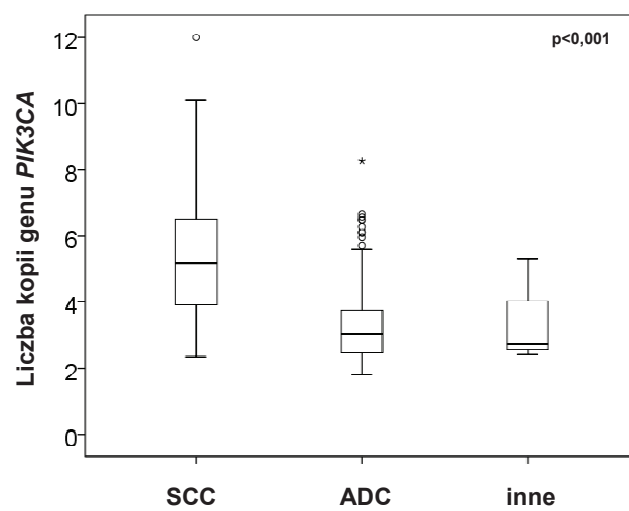
kategorią pTN, a liczbą kopii genu *PIK3CA* i stosunkiem *PIK3CA/CEP3*. Wykazano słaby związek między płcią męską a stosunkiem *PIK3CA/CEP3* ($p=0,043$).

W tabeli 10 przedstawiono szczegółowe dane na temat zależności cech klinicznych i patologicznych od liczby kopii genu *PIK3CA* oraz stosunku *PIK3CA/CEP3*.

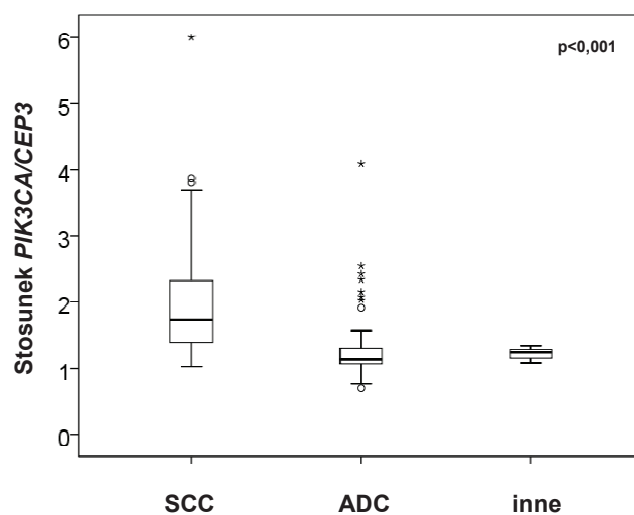
Tabela 10. Zależność liczby kopii genu *PIK3CA* oraz stosunku *PIK3CA/CEP3* od cech klinicznych i patologicznych

Table 10. PIK3CA gene copy number and PIK3CA/CEP3 ratio versus clinical and pathological patient characteristics

Cecha	Liczba kopii genu <i>PIK3CA</i>		Stosunek <i>PIK3CA/CEP3</i>	
	p	r	p	r
Wiek [lata]	0,546	0,045	0,559	-0,043
Płeć	0,387		0,043	
Naciek opłucnej	0,440		0,128	
% martwicy w guzie	<0,001	0,296	<0,001	0,259
Średnica guza	0,656	0,033	0,899	-0,009
Typ histologiczny wg WHO (2004)	<0,001		<0,001	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego wg WHO (2004)	0,052		0,042	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego wg WHO (2015)	0,039		0,074	
Stopień zróżnicowania histologicznego wg WHO (2004)	<0,001		0,003	
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego wg WHO (2015)	0,029		0,177	
pT	0,144		0,119	
pN	0,287		0,349	
Stopień zaawansowania klinicznego	0,317		0,662	



A



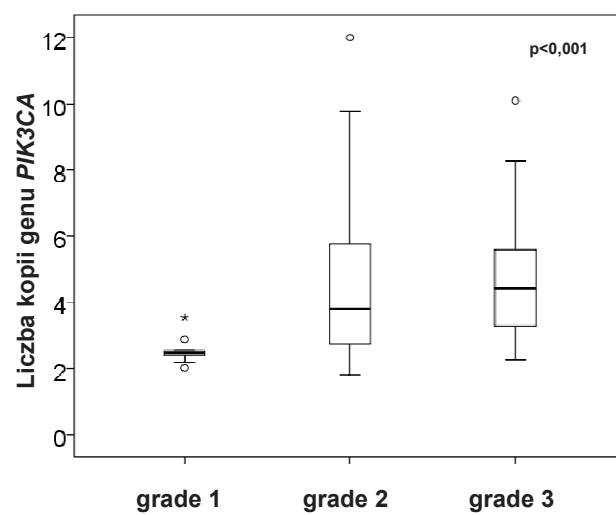
B

Rycina 13. Wykresy przedstawiające zależności liczby kopii genu *PIK3CA* (A) oraz stosunku *PIK3CA/CEP3* (B) od typu histologicznego NDRP

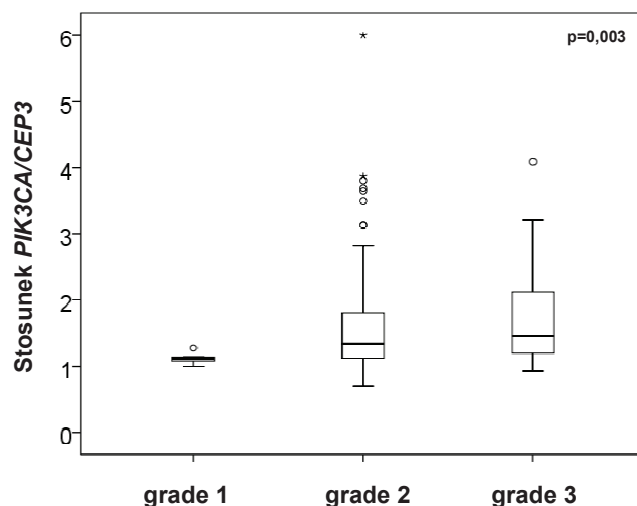
SCC – rak płaskonabłonkowy, ADC – rak gruczołowy

Figure 13. PIK3CA gene copy number (A) and PIK3CA/CEP3 ratio (B) according to NSCLC histological type

SCC – squamous cell carcinoma, ADC – adenocarcinoma



A



B

Rycina 14. Wykresy przedstawiające zależności liczby kopii genu *PIK3CA* (A) oraz stosunku *PIK3CA/CEP3* (B) od stopnia zróżnicowania histologicznego NDRP

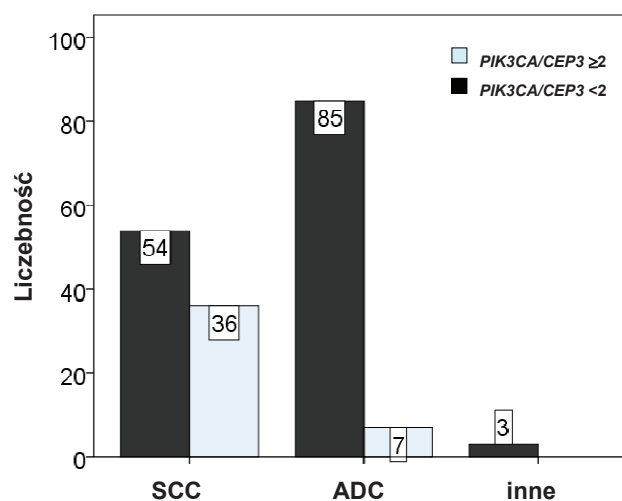
Figure 14. PIK3CA gene copy number (A) and PIK3CA/CEP3 ratio (B) according to NSCLC grade

Amplifikację genu *PIK3CA* stwierdzono w 43 (20,7%) przypadkach niedrobnokomórkowego raka płuca i była ona zdecydowanie częstsza w raku płaskonabłonkowym (rycina 15, $p < 0,001$). Podobnie jak liczba kopii genu *PIK3CA* oraz stosunek *PIK3CA/CEP3*, również amplifikacja występuje częściej w guzach zawierających więcej martwicy (rycina 16, $p < 0,001$). Nie wykazano zależności pomiędzy wiekiem, płcią, naciekiem opłucnej, średnicą guza, podtypem histologicznym raka gruczołowego wg WHO 2004 i 2015, stopniem zróżnicowania histologicznego oraz stopniem zaawansowania klinicznego i kategorią pTN a amplifikacją genu *PIK3CA*.

Tabela 11. Zależność amplifikacji genu *PIK3CA* od cech klinicznych i patologicznychTable 11. *PIK3CA* amplification versus clinical and pathological patient characteristics

Cecha	Brak amplifikacji <i>PIK3CA/CEP3</i> <2	Amplifikacja <i>PIK3CA/CEP3</i> ≥2	p
Wiek [lata]			
			0,670
Płeć			
mężczyźni	95	28	0,828
kobiety	47	15	
Naciek opłucnej			
PLx	0	1	0,098
PL0	73	29	
PL1	60	11	
PL2	2	0	
PL3	7	2	
% martwicy w guzie			
			<0,001
Średnica guza			
			0,681
Typ histologiczny wg WHO (2004)			
rak płaskonabłonkowy	54	36	<0,001
rak gruczołowy	85	7	
rak wielkomórkowy	3	0	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego inwazyjnego wg WHO (2004)			
rak zrazikowy	47	2	0,649
rak brodawkowaty	4	0	
rak lity	17	3	
typ mieszany	15	2	
typ śluzotwórczy	1	0	
typ jasnomórkowy	1	0	
Podtyp histologiczny raka gruczołowego inwazyjnego wg WHO (2015)			
głównie tapetujący	0	0	0,711
głównie zrazikowy	51	3	
głównie brodawkowaty	4	0	
głównie drobnobrodawkowaty	2	0	
głównie lity	27	4	
rak śluzotwórczy	1	0	
Stopień zróżnicowania histologicznego wg WHO (2004)			
grade 1	10	0	0,103

<i>grade 2</i>	95	27	
<i>grade 3</i>	37	16	
Stopień zróżnicowania histologicznego raka gruczołowego inwazyjnego wg WHO (2015)			
<i>grade 1</i>	0	0	0,279
<i>grade 2</i>	54	3	
<i>grade 3</i>	31	4	
pT			
1a	14	3	0,168
1b	25	6	
2a	48	22	
2b	27	9	
3	28	3	
pN			
x	1	1	0,447
0	87	21	
1	32	12	
2	22	9	
Stopień zaawansowania klinicznego			
IA	29	5	0,414
IB	33	14	
IIA	33	8	
IIB	21	5	
IIIA	26	11	

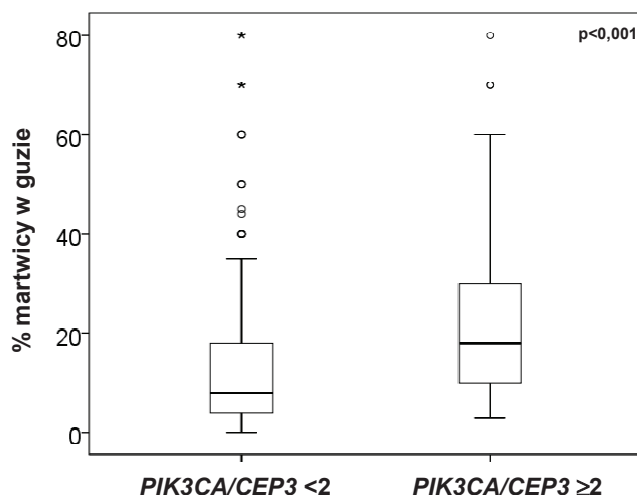


Rycina 15. Wykres przedstawiający zależność amplifikacji genu *PIK3CA* od typu histologicznego NDRP

SCC – rak płaskonabłonkowy, ADC – rak gruczołowy

Figure 15. Histogram plot of *PIK3CA* amplification according to NSCLC histological type

SCC – squamous cell carcinoma, ADC – adenocarcinoma

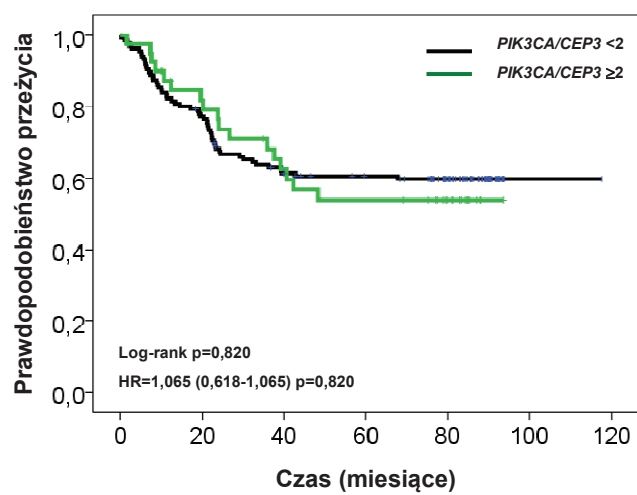


Rycina 16. Wykres przedstawiający zależność amplifikacji genu *PIK3CA* od odsetku martwicy w guzie

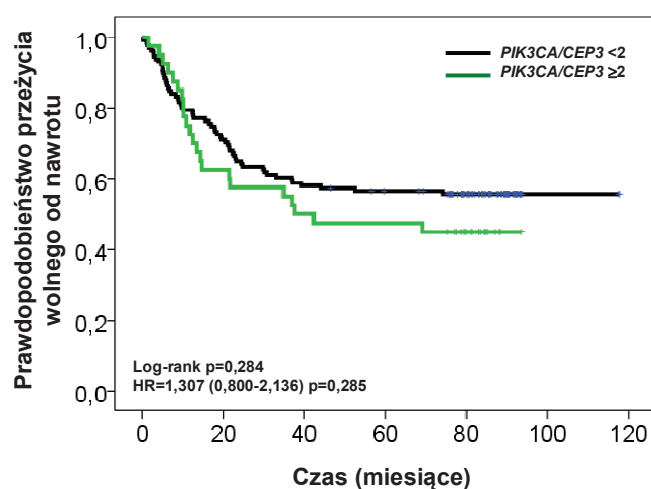
Figure 16. PIK3CA amplification according to percentage of tumor necrosis

W analizie jednoczynnikowej nie stwierdzono związku pomiędzy liczbą kopii genu *PIK3CA* traktowanej jako cecha ciągła a czasem przeżycia (HR=1,063; 95% CI, 0,935-1,185; p=0,273) oraz czasem przeżycia wolnego od nawrotu (HR=1,054; 95% CI, 0,95-1,17; p=0,320). Podobne wyniki uzyskano dla analizy stosunku *PIK3CA/CEP3* (czas przeżycia: HR=1,029; 95% CI, 0,759-1,395; p=0,853; czas przeżycia wolnego od nawrotu: HR=1,071; 95% CI, 0,804-1,426; p=0,639).

Nie zaobserwowano także związku pomiędzy amplifikacją genu *PIK3CA* definiowaną jako stosunek *PIK3CA/CEP3* ≥2 a czasem przeżycia i czasem przeżycia wolnego od nawrotu (rycina 17).



A



B

Rycina 17. Prawdopodobieństwo przeżycia (A) i przeżycia wolnego od nawrotu (B) w zależności od obecności amplifikacji genu *PIK3CA*

*Figure 17. Overall survival (A) and relapse free survival (B) probability curves according to *PIK3CA* gene amplification*

W analizie wieloczynnikowej modelu regresji proporcjonalnego ryzyka Cox'a liczba kopii genu *PIK3CA*, stosunek *PIK3CA/CEP3* oraz amplifikacja genu *PIK3CA* nie posiadają znaczenia rokowniczego dla czasu przeżycia i czasu przeżycia wolnego od nawrotu (tabela 12).

Tabela 12. Wieloczynnikowy model regresji ryzyka proporcjonalnego Cox'a czasu przeżycia i czasu wolnego od nawrotu w zależności od liczby kopii genu *PIK3CA* (model A), stosunku *PIK3CA/CEP3* (model B) oraz amplifikacji genu *PIK3CA* (model C)

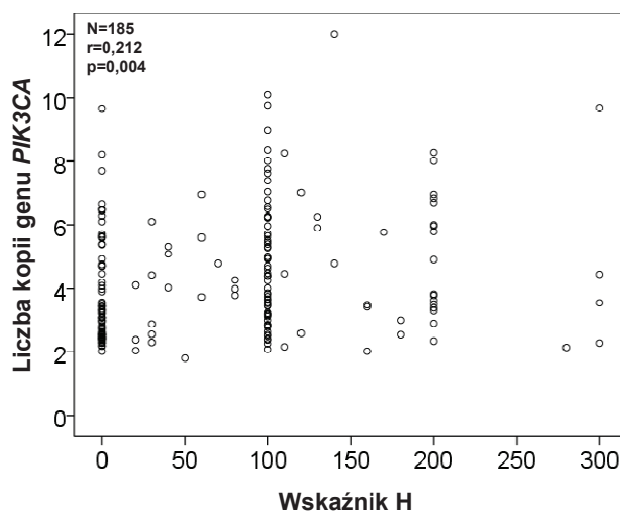
Table 12. Multivariate Cox's regression analysis of PIK3CA gene copy number (A), PIK3CA/CEP3 ratio (B), and PIK3CA amplification (C) for overall survival and relapse free survival adjusted for clinical and pathological patient characteristics

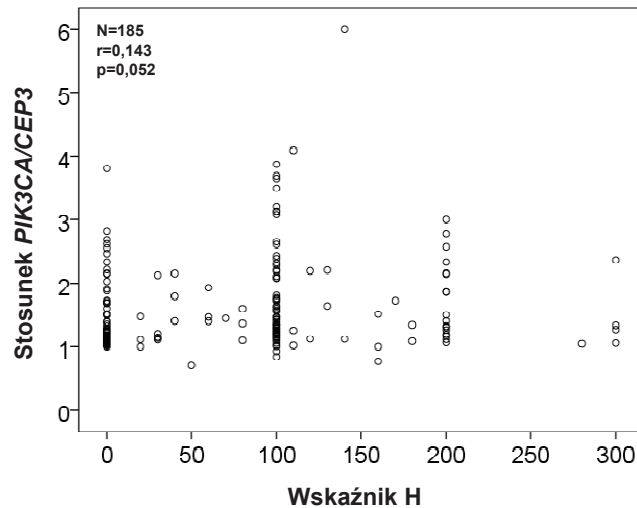
Cecha	OS			RFS		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Model A						
Wiek [lata]	1,003	0,976-1,031	0,830	0,994	0,969-1,021	0,973
Płeć	1,054	0,636-1,748	0,838	1,070	0,665-1,723	0,780
Stopień zróżnicowania histologicznego wg WHO (2004)	1,207	0,758-1,932	0,427	1,007	0,647-1,566	0,976
Stopień zaawansowania klinicznego	1,652	1,371-1,989	<0,001	1,789	1,495-2,141	<0,001
Liczba kopii genu <i>PIK3CA</i>	1,049	0,937-1,174	0,408	1,037	0,931-1,155	0,508
Model B						
Wiek [lata]	1,004	0,997-1,023	0,773	0,995	0,969-1,021	0,701
Płeć	1,060	0,639-1,758	0,822	1,078	0,669-1,737	0,757
Stopień zróżnicowania histologicznego wg WHO (2004)	1,214	0,763-1,931	0,414	1,007	0,648-1,565	0,975
Stopień zaawansowania klinicznego	1,654	1,371-1,996	<0,001	1,794	1,498-2,148	<0,001
Stosunek <i>PIK3CA/CEP3</i>	0,971	0,709-1,331	0,885	1,004	0,745-1,353	0,978
Model C						
Wiek [lata]	1,004	0,997-1,032	0,778	0,995	0,970-1,021	0,714
Płeć	1,056	0,636-1,752	0,833	1,081	0,672-1,740	0,748
Stopień zróżnicowania histologicznego wg WHO (2004)	1,213	0,762-1,930	0,415	1,006	0,648-1,563	0,978
Stopień zaawansowania	1,655	1,371-	<0,001	1,788	1,493-	<0,001

klincznego		1,997			1,141	
Stosunek <i>PIK3CA/CEP3</i> ≥ 2	0,940	0,544- 1,624	0,823	1,107	0,675- 1,815	0,688

4.4. Zależność ekspresji białka *PIK3CA* od liczby kopii genu *PIK3CA*

Dla 185 (88,9%) przypadków uzyskano dane dotyczące zarówno ekspresji białka jak i liczby kopii genu *PIK3CA*. Wykazano związek między ekspresją białka *PIK3CA* oraz liczbą kopii genu *PIK3CA* (obie cechy analizowano jako zmienne ciągłe; $p=0,004$, $r=0,212$). Nie zaobserwowano natomiast podobnej zależności pomiędzy ekspresją białka *PIK3CA* a stosunkiem *PIK3CA/CEP3* (obie cechy analizowano jako zmienne ciągłe; $p=0,052$, $r=0,143$).



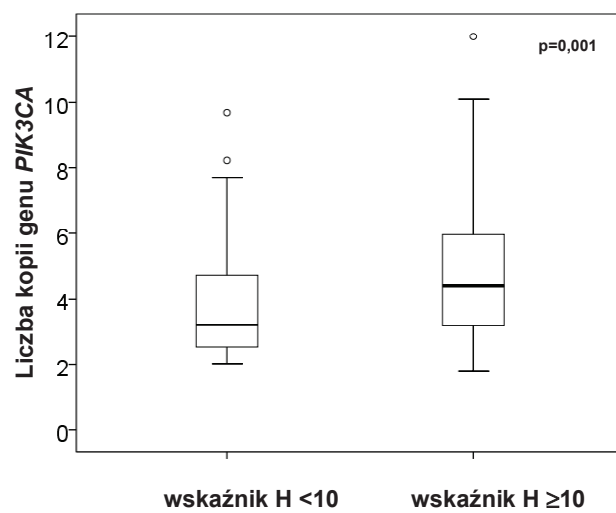


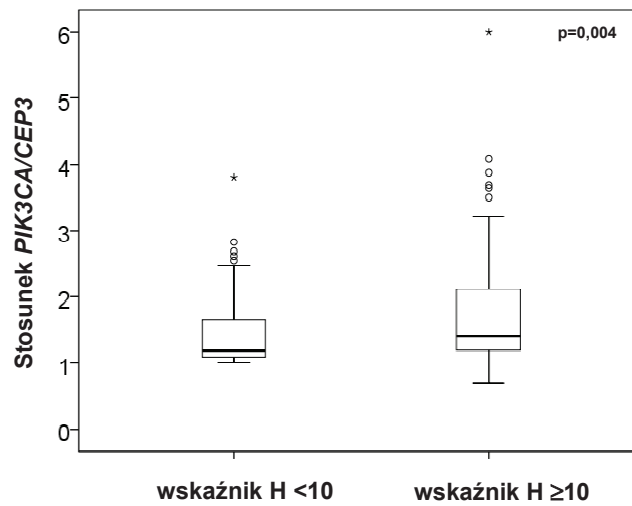
B

Rycina 18. Wykresy rozrzutu przedstawiające zależność ekspresji białka PIK3CA od liczby kopii genu *PIK3CA* (A) oraz stosunku *PIK3CA/CEP3* (B)

Figure 18. Scatterplot of PIK3CA protein expression according to PIK3CA gene copy number (A) and PIK3CA/CEP3 ratio (B)

Po dokonaniu podziału wskaźnika H PIK3CA na dwie grupy z punktem odcięcia ≥ 10 decydującym o uznaniu odczynu za dodatni, wykazano związek zarówno między obecnością białka PIK3CA a liczbą kopii genu *PIK3CA* ($p=0,001$) jak i stosunkiem *PIK3CA/CEP3* ($p=0,004$).

**A**



B

Rycina 19. Wykresy przedstawiające zależność liczby kopii genu *PIK3CA* (A) i stosunku *PIK3CA/CEP3* (B) od wartości wskaźnika H z punktem odcięcia równym 10

Figure 19. PIK3CA gene copy number (A) and PIK3CA/CEP3 ratio (B) according to H-score of 10 as cutoff point

W 43 przypadkach, w których wykazano obecność amplifikacji genu *PIK3CA* w komórkach nowotworu, nie obserwowano ekspresji białka *PIK3CA*, jednocześnie w 86 przypadkach z dodatnią reakcją barwną na obecność białka *PIK3CA* nie stwierdzono amplifikacji genu.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Terapie ukierunkowane molekularnie stanowią obecnie jedną z głównych gałęzi rozwoju badań w zakresie leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca, stwarzając zupełnie nowe możliwości terapeutyczne. Identyfikacja biomarkerów o znaczeniu predykcyjnym jest niezwykle ważna z punktu widzenia selekcji chorych, którzy mogą odnieść korzyści z zastosowanego leczenia. Obecnie znanych jest kilka markerów mających zastosowanie podczas kwalifikacji chorych na NDRP, w tym głównie raka gruczołowego, do leczenia określonymi lekami. Przykładem mogą być tu rearanżacje genów *ALK* lub *ROS1*, których obecność należy wykazać, aby wdrożyć leczenie kryzotynibem [46]. Znacznie mniej markerów predykcyjnych znajduje zastosowanie w leczeniu innych podtypów histologicznych NDRP. Ważnym krokiem w procesie poszukiwania nowych markerów o potencjalnym znaczeniu w przewidywaniu odpowiedzi na leczenie inhibitorami jest ich szczegółowa charakterystyka pod względem częstości występowania, wartości prognostycznej oraz metod detekcji określonych zaburzeń molekularnych w materiale tkankowym. Dodatkowo ważnym elementem jest także ocena stosowanych metod analizy danych biomarkerów pod względem dostępności, kosztów oraz łatwości i wiarygodności ich zastosowania w codziennej praktyce klinicznej.

Wstępne wyniki badań wykazały, iż podjednostka katalityczna $\alpha 3$ -kinazy fosfatydyloinozytolu może mieć zastosowanie jako marker molekularny odpowiedzi na leczenie inhibitorami PI3K, szczególnie w raku płaskonabłonkowym płuca. Niniejsza praca jest jedyną skupiającą się nad oceną liczby kopii genu *PIK3CA* metodą dual-ISH, z jednoczesną immunohistochemiczną oceną poziomu białka PIK3CA, w grupie pacjentów chorych na NDRP.

5.1. Charakterystyka chorych

Badaniem objęto grupę 208 chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca. Średnia wieku chorych wynosiła 62,8 lat, większość stanowili mężczyźni (67,3%, $n=140/208$). U ponad połowy przypadków ustalono rozpoznanie raka płakonabłonkowego (51,9%, $n=108/208$), najczęściej w średnim stopniu zróżnicowania histologicznego (*grade 2*). Analizowany materiał jest reprezentatywny dla populacji chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca [158].

Najważniejszym czynnikiem rokowniczym w NDRP wciąż pozostaje stopień zaawansowania wg klasyfikacji TNM. Obecnie dysponujemy 7 jej edycją. Stopień zaawansowania klinicznego i patologicznego jest również nadal najważniejszym czynnikiem decydującym o wyborze leczenia pacjentów. Inne cechy patomorfologiczne, takie jak obecność nacieku opłucnej i rozmiar guza,

jako cechy decydujące o zaklasyfikowaniu guza do odpowiedniej kategorii pT, są czynnikami prognostycznymi związanymi silnie ze stopniem zaawansowania [99].

Wykonana przez nas analiza statystyczna wpływu cech klinicznych i patologicznych na przebieg choroby pozostaje w zgodności z przedstawionymi w piśmiennictwie danymi. Wykazano związek między czasem przeżycia chorych a wielkością guza ($p < 0,001$), stopniem naciekania opłucnej ($p = 0,001$), stopniem zróżnicowania histologicznego ($p = 0,023$), stopniem zaawansowania klinicznego ($p < 0,001$), oraz cechą pT ($p = 0,012$) i pN ($p < 0,001$) nowotworu.

5.2. Immunohistochemiczna ocena poziomu białka PIK3CA

Jednym z celów pracy była ocena poziomu białka PIK3CA z zastosowaniem techniki immunohistochemicznej. Nadal dużym problem w ocenie ekspresji białek stanowi odpowiednie dobranie skali pozwalającej na określenie siły reakcji barwnej w technice immunohistochemicznej. Obecnie nie istnieje jedna uniwersalna, używana przez wszystkich badaczy skala. Jedną z najbardziej popularnych jest metoda półilościowa oparta o wskaźnik H. W niniejszej pracy przyjęto wskaźnik H z punktem odcięcia, decydującym o uznaniu odczynu za pozytywny, równym 10. W jednej z ostatnio opublikowanej prac dotyczącej ekspresji białka PIK3CA w NDRP, skala oceny jest podobna, tj. przyjęto próg powyżej 10% komórek raka z produktem reakcji barwnej jako wartość odczynu dodatniego [149]. Podobnie oceniono odczyn immunohistochemiczny w komórkach raka jelita grubego w pracy Zhu i wsp [160]. W pozostałych doniesieniach, w których badano ekspresję białka PIK3CA w innych nowotworach litych, skale oceny także opierały się na analizie stopnia wybarwienia i odsetka wybarwionych komórek nowotworowych. Różnice polegały na zastosowaniu innych wartości granicznych, przy których odczyny uznawano za dodatnie. I tak przykładowo Liu i wsp. przyjęli za taką wartość $\geq 20\%$ [78]. Omówione różnice w ocenie odczynów IHC mogą wpływać na wyniki i być główną przyczyną rozbieżności. Punkt odcięcia wskaźnika H w technice immunohistochemicznej wynoszący 10 jest również powszechnie przyjęty dla oceny innych białek, np. dla receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) [53, 138].

W zbadanych przez nas 191 przypadkach NDRP w 120 (62,82%) zanotowano ekspresję białka PIK3CA, z wartością wskaźnika H większą niż 10. W pracy Wang i wsp. odnotowano nieco niższy odsetek przypadków NDRP z ekspresją białka PIK3CA (48,6%, $n = 69/142$) [149], podobnie jak w pracy Lin i wsp. (43%, $n = 34/80$), co można tłumaczyć wspomnianą już odmienną skalą oceny ekspresji PIK3CA [47, 77]. Są to jedyne dostępne w piśmiennictwie prace, w których oceniano immunohistochemiczną ekspresję tego białka w NDRP.

W innych typach litych nowotworów złośliwych, w których badano obecność białka PIK3CA, odnotowano również dość wysoki odsetek przypadków z reakcją barwną w komórkach guza, wahający się w granicach 50% (n=33/66) w raku przełyku [3], 59% (n=235/398) w raku jelita grubego [59] i 73% (n=45/62) w raku jajnika [1].

Wysoki odsetek nowotworów z wysoką ekspresją podjednostki katalitycznej p110 α w różnych typach nowotworów, w tym w raku płuca, sugeruje wzmożoną aktywację ścieżki sygnałowej PI3K/AKT w nowotworach złośliwych. Zjawisko to może być związane z mutacjami w genie *PIK3CA*, jak również z wpływem sygnałów aktywujących ścieżkę PI3K/AKT, czego podłożem molekularnym mogą być mutacje w obrębie genów kodujących receptory i czynniki wzrostu oraz podjednostkę regulatorową p85 [77]. Nie można także pominąć ewentualnego wpływu mechanizmów epigenetycznych, takich jak metylacja DNA, modyfikacja białek histonowych czy też regulacyjny wpływ swoistych cząstek mikroRNA [119].

Należy dodać, iż kilka prac wskazuje na związek aktywacji ścieżki sygnałowej PI3K i związanej z tym wysokiej ekspresji białka PIK3CA, z pojawianiem się przerzutów węzłowych w raku płaskonabłonkowym przełyku oraz w raku jelita grubego i żołądka, co także może być pomocne w wyodrębnianiu grup pacjentów o szczególnym ryzyku progresji nowotworowej [3, 78, 160]. W jedynej pracy z 2001 roku gdzie przeprowadzono badania w grupie chorych na zaawansowanego raka płuca, także udowodniono związek wysokiego poziomu podjednostki p110 α w ogniskach pierwotnych raka oraz przerzutach węzłowych i do wątroby [77]. Taką zależność można tłumaczyć wpływem aktywacji kinazy α 3-fosfatydyloinozytolu na ruchliwość komórek [91].

Ponadto w raku płaskonabłonkowym rejonu głowy i szyi wykazano, iż podwyższona ekspresja białka PIK3CA ma związek z progresją zmian od dysplazji do raka inwazyjnego [152]. Podobnych badań nie przeprowadzono w grupie chorych na raka płuca.

W pracy Wang i wsp. nie wykazano zależności ekspresji białka PIK3CA od wieku, płci, palenia tytoniu, podtypu i stopnia zróżnicowania histologicznego, a także stopnia zaawansowania klinicznego i stopnia zajęcia węzłów chłonnych (pN) [149]. Podobnie w innych nowotworach nie znaleziono zależności między poziomem białka PIK3CA a cechami klinicznymi i patologicznymi [3, 59, 78]. Wykazano jedynie, iż nadekspresja PIK3CA występuje częściej w niskozróżnicowanych rakach płuca [77] oraz ma związek z obecnością przerzutów węzłowych w płaskonabłonkowym raku przełyku [3].

Obecnie wiedza na temat zmian genetycznych w raku gruczołowym jest znacznie szersza, niż znajomość molekularnych zaburzeń w raku płaskonabłonkowym płuca, z czym wiąże się fakt, iż większość znanych dziś terapii celowanych w raku płuca wdrażana jest właśnie w raku gruczołowym. Obecność mutacji i amplifikacji *PIK3CA* w raku płaskonabłonkowym płuca była już wcześniej potwierdzona, ale niewiele wiadomo o stopniu ekspresji białka PIK3CA [51]. W

niniejszej pracy wykazano, iż ekspresja białka PIK3CA (wskaźnik $H \geq 10$) podobnie jak amplifikacja genu, częściej występuje w raku płaskonabłonkowym niż gruczolowym. Ocena ewentualnej wartości predykcyjnej badania immunohistochemicznego we wstępnej kwalifikacji pacjentów do leczenia inhibitorami PI3K wymaga badań prospektywnych, jednakże wykazanie wysokiego odsetka przypadków raków płaskonabłonkowych wykazujących ekspresję PIK3CA może stanowić podstawę do podjęcia takich badań. Obecnie w nielicznych badaniach klinicznych z zastosowaniem inhibitorów PI3K, do selekcji pacjentów stosuje się głównie techniki molekularne. Biorąc pod uwagę szerokie zastosowanie IHC do wstępnej selekcji chorych do leczenia ukierunkowanego molekularnie np. inhibitorami ALK, ROS1, MET, w przyszłości może zaistnieć potrzeba podobnego użycia PIK3CA IHC z zastosowaniem odpowiedniej skali oceny ekspresji białka, co potwierdza zasadność prowadzonych przez nas badań.

W niniejszej pracy wykazaliśmy zależność poziomu białka PIK3CA od podtypu i stopnia zróżnicowania histologicznego raka gruczolowego ocenianego wg najnowszej klasyfikacji WHO z 2015 roku. Dodatnia reakcja barwna występowała najczęściej w podtypie raka gruczolowego w przeważającej części zrazikowego w średnim stopniu zróżnicowania histologicznego (*grade 2*) oraz w kilku przypadkach w podtypie głównie litym. Zaobserwowany związek należy interpretować z ostrożnością ze względu na niską liczebność podgrup – wymaga on potwierdzenia w większej grupie przypadków chorych na raka gruczolowego płuca.

Ponadto w niniejszej pracy wykazano, iż poziom białka PIK3CA (oceniany jako cecha ciągła oraz z punktem odcięcia wskaźnika $H \geq 10$) ma związek z wielkością guza. Wraz ze wzrostem średnicy guza maleje poziom białka PIK3CA w komórkach raka płuca. Ponieważ nasze badania przeprowadzono na mikromacierzach tkankowych zawierających jedynie fragmenty guzów, wynik ten może być uwarunkowany heterogennością guza w zakresie ekspresji PIK3CA. W guzach dużych dysponujemy znacznie mniejszym fragmentem całości, niż w zmianach mniejszych. Biorąc pod uwagę ewentualne biologiczne wytłumaczenie zaistniałej zależności można przypuszczać, iż aktywacja szlaku PI3K/AKT następuje na wcześniejszych etapach rozwoju nowotworu i jest hamowana wraz ze wzrostem średnicy guza. Istnieją doniesienia wskazujące, iż wraz ze zmianą średnicy guza zmienia się jego transkryptom, a co za tym idzie i proteom [12].

Dane dotyczące zależności nadekspresji p110 α od czasu przeżycia chorych różnią się w zależności od analizowanej grupy chorych. W naszej pracy ekspresja PIK3CA nie miała związku z czasem przeżycia pacjentów chorych na NDRP zarówno w analizie jedno- jak i wieloczynnikowej. Podobnie analiza przeżycia kształtuje się u chorych na raka jelita grubego [59]. Odmienne wnioski wysunięto w pracy Abe i wsp., gdzie wykazano dłuższy czas przeżycia chorych na raka jasnokomórkowego jajnika u chorych z wysokim poziomem białka PIK3CA ($HR=0,3$; 95% CI, 0,09-0,9; $p=0,04$) [1]. Tak odmienne wyniki wskazują na

możliwość różnego wpływu aktywacji ścieżki PI3K/AKT na przebieg choroby w różnych typach nowotworów złośliwych. Ze względu na małą liczbę doniesień konieczne są dalsze badania w celu wyjaśnienia tego zagadnienia. Należy dodać, iż w dwóch wcześniej wspomnianych pracach Wang i wsp. oraz Lin i wsp., nie wykonano analizy przeżycia chorych na NDRP w zależności od ekspresji białka PIK3CA [77, 149].

5.3. Liczba kopii genu *PIK3CA* w NDRP

Kolejnym celem pracy była ocena liczby kopii genu *PIK3CA* techniką hybrydyzacji *in situ* z zastosowaniem sond znakowanych chromogenem oraz jonami srebra (CISH/SISH). Wykazaliśmy obecność amplifikacji genu *PIK3CA* w 43 (20,7%) przypadkach niedrobnokomórkowego raka płuca i była ona znacznie częstsza w raku płaskonabłonkowym. Wynik ten pozostaje w zgodności z danymi przedstawionymi w piśmiennictwie. Inni autorzy wykazali obecność amplifikacji genu *PIK3CA* badanej za pomocą technik qRT-PCR czy FISH z częstością w granicach od 18,3% do 31,3% NDRP. Wszyscy autorzy zgodnie podkreślają związek występowania zwiększonej liczby kopii genu *PIK3CA* w raku płaskonabłonkowym w stosunku do innych podtypów histologicznych raka płuca, w tym w szczególności w porównaniu do raka gruczołowego [4, 60, 98, 133].

W niniejszej rozprawie nie wykazano zależności pomiędzy liczbą kopii genu *PIK3CA* a większością badanych cech klinicznych lub patologicznych, np. wiekiem, płcią, naciekiem opłucnej, średnicą guza, podtypem histologicznym raka gruczołowego wg WHO 2004 i 2015, stopniem zróżnicowania histologicznego oraz stopniem zaawansowania klinicznego i kategorią pT oraz pN. Podobnie w pracy Angulo i wsp. nie znaleziono zależności między amplifikacją a płcią, stopniem zróżnicowania histologicznego oraz stopniem zaawansowania klinicznego [4]. Toschi i wsp. oraz Wang i wsp. wykazali, a Ji i wsp. zaobserwowali tendencję do częstszego występowania amplifikacji u chorych płci męskiej i osób palących [60, 133, 149]. W naszym opracowaniu podobną korelację z płcią męską zaobserwowano analizując stosunek *PIK3CA/CEP3* jako cechę ciągłą ($p=0,043$).

W niniejszej pracy wykazano związek amplifikacji genu *PIK3CA*, a także liczby kopii genu i stosunku *PIK3CA/CEP3* z odsetkiem martwicy w guzie. Cecha ta nie była analizowana w innych doniesieniach. Taką zależność można tłumaczyć wpływem zwiększonej liczby kopii genu *PIK3CA* na aktywację mechanizmów stymulujących szybką proliferację guza.

W niniejszej rozprawie wykazano również, iż liczba kopii genu *PIK3CA* oraz stosunek *PIK3CA/CEP3* posiadają związek ze stopniem zróżnicowania histologicznego (tabela 10).

Niewiele jest prac oceniających różnice molekularne pomiędzy poszczególnymi typami raka gruczołowego, w szczególności w odniesieniu do niedawno opublikowanej nowej klasyfikacji histologicznej raka płuca [135]. W niniejszej pracy rak gruczołowy został sklasyfikowany na podtypy histologiczne zgodnie z klasyfikacją WHO z 2004 i 2015 roku. Na uwagę zasługuje fakt zależności stosunku *PIK3CA/CEP3* oraz liczby kopii genu *PIK3CA* mierzonych jako cechy ciągle od podtypu histologicznego raka gruczołowego ocenianego wg kryteriów WHO, odpowiednio z 2004 i 2015 roku. Jest to o tyle ciekawe, iż podobne zależności wykazaliśmy w stosunku do obecności białka PIK3CA. Wydaje się, iż aktywacja ścieżki PI3K/AKT może być częstsza w podtypie głównie zrazikowym i litym raka gruczołowego.

W analizowanych przez nas przypadkach, w 4 stosunek liczby kopii genu *PIK3CA/CEP3* był mniejszy od 1 (2,16%, $n=4/185$). Podobny wynik uzyskał Okudela i wsp. (2,6%, $n=3/115$). Autor łączył utratę sygnałów fluorescencji raczej z błędami wynikającymi z interpretacji wykorzystywanej przez siebie metody FISH, niż z rzeczywistą utratą heterozygotyczności [98]. My także skłaniamy się ku takiemu wyjaśnieniu utraty sygnałów pochodzących z genu *PIK3CA*, aczkolwiek powtarzający się w dwóch pracach podobny odsetek przypadków monosomicznych nakazuje pewną ostrożność. Być może jednak w części przypadków NDRP dochodzi do utraty jednej kopii genu *PIK3CA*. Zjawisko to wymaga potwierdzenia innymi metodami molekularnymi, np. porównawczą hybrydyzacją genomową (CGH). Funkcjonalne znaczenie tego zjawiska pozostaje niewyjaśnione.

W niniejszej pracy doktorskiej nie wykazano związku między całkowitym czasem przeżycia i czasem przeżycia wolnego od nawrotu a amplifikacją genu *PIK3CA*, liczbą kopii genu *PIK3CA* i stosunkiem *PIK3CA/CEP3*. Spośród wszystkich znanych nam autorów badających liczbę kopii genu *PIK3CA* w NDRP jedynie Toschi i wsp. podają, iż czas przeżycia jest dłuższy u chorych na NDRP z amplifikacją genu *PIK3CA* [133].

5.4. Zależność ekspresji białka *PIK3CA* od liczby kopii genu *PIK3CA*

W niniejszej pracy wykazano zależność między poziomem białka PIK3CA a liczbą kopii genu *PIK3CA* ocenianą jako cecha ciągła ($p=0,004$, $r=0,212$). Ponadto przyjmując za punkt odcięcia wskaźnika H wartość 10 wykazano zależność tak definiowanego odczynu pozytywnego zarówno z liczbą kopii genu *PIK3CA* ($p=0,001$) jak i stosunkiem *PIK3CA/CEP3* ($p=0,004$).

W jedynej pracy gdzie oceniano oba te parametry w NDRP nie udało się wykazać takiej zależności ($p=0,463$), być może ze względu na mniej liczną i bardziej wyselekcjonowaną grupę pacjentów. Należy dodać, iż autorzy wykazali zależność wysokiego poziomu p110 α od mutacji punktowych genu *PIK3CA*

($p < 0,0001$) [149]. Podobnie nie wykazano zależności poziomu białka p110 α od amplifikacji genu analizowanego metodą qRT-PCR w raku przełyku [3].

W innych nowotworach zaś, podobnie jak w naszej pracy pokazano zależność amplifikacji od poziomu białka PIK3CA. Jehan i wsp. posługując się metodą FISH oraz qRT-PCR wykazali pozytywną korelację między amplifikacją genu *PIK3CA* a ocenianą immunohistochemicznie ekspresją podjednostki p110 α ($p = 0,0428$, $r = 0,1032$) w raku jelita grubego [59]. Podobnie analiza przypadków raka jasnokomórkowego jajnika przez Abe i wsp. wykazała związek amplifikacji lub mutacji z wysokim poziomem białka PIK3CA ($p = 0,009$) [1].

Jak już wcześniej wspomniano, wysoki poziom podjednostki p110 α 3-kinazy fosfatydyloinozytolu może mieć różne podłoże molekularne. Zarówno z naszych jak i z innych przedstawionych badań wynika, iż wysoki poziom białka PIK3CA ma związek z amplifikacją lub mutacją *PIK3CA*, co wskazuje na możliwość aktywacji ścieżki PI3K/AKT na drodze tych dwóch zaburzeń genetycznych. Jednakże nieznane są dodatkowe mechanizmy regulacyjne wpływu powyższych czynników na poziom białka, np. czynniki transkrypcyjne takie jak FOXO3a, czy też swoiste mikroRNA [1].

Wyniki naszej pracy są zachęcające z punktu widzenia możliwego oznaczania poziomu białka PIK3CA jako wstępnego badania diagnostycznego w celu dalszej molekularnej selekcji pacjentów do leczenia inhibitorami PI3K. Takie postępowanie pozwoli obniżyć koszty kwalifikacji pacjentów i potencjalnie zwiększyć skuteczność leczenia, podobnie jak ma to miejsce przy kwalifikacji do leczenia trastuzumabem czy kryzotynibem.

5.5. CISH/SISH jako metoda oceny liczby kopii genu

W pracy do oceny liczby kopii genu zastosowano stosunkowo mało znaną i rzadko stosowaną metodą hybrydyzacji *in situ* z zastosowaniem sond znakowanych chromogenem i jonami srebra, która stanowi alternatywę dla szeroko stosowanej metody FISH. Jak wspomniano we wstępie niniejszej rozprawy, metoda dual-ISH jest korzystna ze względu przede wszystkim na możliwość rzetelnej oceny morfologii jąder komórkowych przez patomorfologa w trakcie analizy liczby kopii genów. Pokazaliśmy, iż metoda ta pozwala skutecznie ocenić liczbę kopii genu. Jedynie w 3 przypadkach nie uzyskaliśmy wiarygodnych sygnałów zarówno w zakresie centromeru jak i genu *PIK3CA* (1,62%, $n = 3/185$). Ponadto dodatkowym dużym atutem metody jest jej pełna automatyzacja, co pozwala na utrzymanie jednakowych, wystandaryzowanych warunków oznaczenia, a także nie wymaga angażowania specjalnie wyszkolonego personelu. Co więcej, do oceny materiału wystarczy zwykły mikroskop optyczny stanowiący standardowe wyposażenie każdej pracowni patomorfologicznej, a materiał może być archiwizowany latami bez groźby utraty sygnałów. Korzystnie także przedstawia się

kalkulacja kosztów wykonania dual-ISH. Średni koszt jednego badania to 600 zł, czyli porównywalnie z wyceną jednego testu FISH dla większości komercyjnie dostępnych sond molekularnych.

Wyniki badań porównujących zgodność pomiędzy techniką FISH, a dual-ISH są w znamienitej większości przypadków zadowalające, a współczynnik zgodności κ sięga wartości bliskich 1,0 [5, 55, 76, 90].

Podsumowując metoda CISH/SISH jako stosunkowo niedroga, łatwa w wykonaniu i możliwa do oceny przez praktycznie każdego patologa po krótkim przeszkoleniu, stanowić może doskonałe narzędzie diagnostyczne, łatwo dostępne i możliwe do stosowania w praktyce klinicznej.

6. WNIOSKI

1. Wysoki poziom podjednostki katalitycznej p110 α oraz amplifikacja genu *PIK3CA* są obserwowane często w niedrobnokomórkowym raku płuca, co może mieć związek ze wzmożoną aktywacją ścieżki sygnałowej PI3K/AKT w tym typie nowotworu.
2. Wysoki poziom białka PIK3CA częściej występuje w raku płaskonabłonkowym płuca i w guzach o mniejszej średnicy.
3. Podwyższona liczba kopii genu *PIK3CA* jest częściej obserwowana w raku płaskonabłonkowym płuca, w porównaniu do innych typów histologicznych niedrobnokomórkowego raka płuca.
4. Amplifikacja genu *PIK3CA* występuje częściej w guzach o wysokim odsetku martwicy.
5. Istnieje korelacja między ekspresją białka p110 α ocenianą z zastosowaniem wskaźnika H a liczbą kopii genu *PIK3CA* analizowaną metodą dual-ISH.
6. Poziom białka p110 α oraz liczba kopii genu *PIK3CA* nie mają znaczenia rokowniczego u chorych na operacyjnego niedrobnokomórkowego raka płuca.
7. Ocena statusu białka PIK3CA metodą IHC oraz liczby kopii genu *PIK3CA* metodą dual-ISH mogą stanowić cenne narzędzia diagnostyczne przy kwalifikacji pacjentów do leczenia inhibitorami PI3K.
8. Metoda CISH/SISH jest przydatnym narzędziem diagnostycznym w ocenie liczby kopii genu do stosowania w codziennej praktyce klinicznej.

7. PIŚMIENICTWO

1. Abe A., Minaguchi T., Ochi H., Onuki M., Okada S., Matsumoto K., Satoh T., Oki A., Yoshikawa H.: PIK3CA overexpression is a possible prognostic factor for favorable survival in ovarian clear cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2013, 44, 2, 199-207.
2. Abubaker J., Bavi P., Al-Harbi S., Ibrahim M., Siraj A.K., Al-Sanea N., Abduljabbar A., Ashari L.H., Alhomoud S., Al-Dayel F., Uddin S., Al-Kuraya K.S.: Clinicopathological analysis of colorectal cancers with PIK3CA mutations in Middle Eastern population. *Oncogene* 2008, 27, 25, 3539-3545.
3. Akagi I., Miyashita M., Makino H., Nomura T., Hagiwara N., Takahashi K., Cho K., Mishima T., Ishibashi O., Ushijima T., Takizawa T., Tajiri T.: Overexpression of PIK3CA is associated with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2009, 34, 3, 767-775.
4. Angulo B., Suarez-Gauthier A., Lopez-Rios F., Medina P.P., Conde E., Tang M., Soler G., Lopez-Encuentra A., Cigudosa J.C., Sanchez-Cespedes M.: Expression signatures in lung cancer reveal a profile for EGFR-mutant tumours and identify selective PIK3CA overexpression by gene amplification. *J Pathol.* 2008, 214, 3, 347-356.
5. Arnould L., Roger P., Macgrogan G., Chenard M.P., Balaton A., Beauclair S., Penault-Llorca F.: Accuracy of HER2 status determination on breast core-needle biopsies (immunohistochemistry, FISH, CISH and SISH vs FISH). *Mod Pathol.* 2012, 25, 5, 675-682.
6. Badzio A., Wynes M.W., Dziadziuszko R., Merrick D.T., Pardo M., Rzyman W., Kowalczyk A., Singh S., Ranger-Moore J., Manriquez G., Gaire F., Jassem J., Hirsch F.R.: Increased insulin-like growth factor 1 receptor protein expression and gene copy number in small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010, 5, 12, 1905-1911.
7. Barbareschi M., Buttitta F., Felicioni L., Cotrupi S., Barassi F., Del Grammastro M., Ferro A., Dalla Palma P., Galligioni E., Marchetti A.: Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2007, 13, 20, 6064-6069.

8. Battifora H.: The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest.* 1986, 55, 2, 244-248.
9. Beckmann A., Brandt B.H., Vogt U., Zänker K.S., Brandt B.H.: Direct-double-differential PCR for gene dosage quantification of c-myc. *Clin Chem.* 1999, 45, 141-143.
10. Besse B., Soria J., Gomez-Roca C., Ware J.A., Adjei A., Dy G.K., Shankar G., Brachmann R.K., Groen H.J.: A phase Ib study to evaluate the PI3-kinase inhibitor GDC-0941 with paclitaxel (P) and carboplatin (C), with and without bevacizumab (BEV), in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol.* 2011; 29.
11. Brana I., Siu L.L.: Clinical development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors for cancer treatment. *BMC Med.* 2012; 11, 10, 161.
12. Bratslavsky G., Sanford T., Srinivasan R., Aprelikova O., Liu J., Quezado M., Merino M., Linehan W.M.: Differential genetic expression in large versus small clear cell renal cell carcinoma: results from microarray analysis. *J Cancer.* 2011, 2, 271-279.
13. Buttitta F., Felicioni L., Barassi F., Martella C., Paolizzi D., Fresu G., Salvatore S., Cuccurullo F., Mezzetti A., Campani D., Marchetti A.: PIK3CA mutation and histological type in breast carcinoma: high frequency of mutations in lobular carcinoma. *J Path.* 2006, 208, 3, 350-355.
14. Byron S.A., Gartside M., Powell M.A., Wellens C.L., Gao F., Mutch D.G., Goodfellow P.J., Pollock P.M.: FGFR2 point mutations in 466 endometrioid endometrial tumors: relationship with MSI, KRAS, PIK3CA, CTNNB1 mutations and clinicopathological features. *PLoS One.* 2012. 7, 2.
15. Byun D.S., Cho K., Ryu B.K., Lee M.G., Park J.I., Chae K.S., Kim H.J., Chi S.G.: Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *Int J Cancer.* 2003, 104, 3, 318-327.
16. Campbell I.G., Russell S.E., Choong D.Y.H., Montgomery K.G., Ciavarella M.L., Hooi C.S., Cristiano B.E., Pearson R.B., Phillips W.A.: Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res.* 2004, 64, 21, 7678-7681.

17. Cantley L.C.: The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002, 31, 296, 1655-1657.
18. Carpenter C.L., Cantley L.C.: Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 1996, 8, 2, 153-158.
19. Catusus L., Gallardo A., Cuatrecasas M., Prat J.: PIK3CA mutations in the kinase domain (exon 20) of uterine endometrial adenocarcinomas are associated with adverse prognostic parameters. *Mod Pathol.* 2008, 21, 2, 131-139.
20. Catusus L., Gallardo A., Cuatrecasas M., Prat J.: Concomitant PI3K-AKT and p53 alterations in endometrial carcinomas are associated with poor prognosis. *Mod Pathol.* 2009, 22, 4, 522-529.
21. Chalhoub N., Baker S.J.: PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009, 4, 127-150
22. Chandarlapaty S., Heguy A., Modi S., Patil S., Heguy A., Morrow M., Modi S., Norton L., Rosen N., Hudis C., King T.A.: Frequent mutational activation of the PI3K-AKT pathway in trastuzumab-resistant breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2012, 18, 24, 6784-6791.
23. Chang H.W., Aoki M., Fruman D., Auger K.R., Bellacosa A., Tsichlis P.N., Cantley L.C., Roberts T.M., Vogt P.K.: Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science* 1997, 276, 5320, 1848-1850.
24. Chiosea S.I., Grandis J.R., Lui V.W.Y., Diergaarde B., Maxwell J.H., Ferris R.L., Kim S.W., Luvison A., Miller M., Nikiforova M.N.: PIK3CA, HRAS and PTEN in human papillomavirus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2013, 17, 13, 602-602.
25. Cidon E.U., Ellis S.G., Inam Y., Adeleke S., Zarif S., Geldart T.: Molecular targeted agents for gastric cancer: a step forward towards personalized therapy. *Cancers* 2013, 5, 1, 64-91.
26. Cizkova M., Susini A., Vacher S., Cizeron-Clairac G., Andrieu C., Driouch K., Fourme E., Lidereau R., Bièche I.: PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER alpha, PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res.* 2012, 14, 1, R28.

27. Clark B.Z., Bhargava R.: Bright-field microscopy for HER2 gene assessment: not just DISH-ful thinking? *Am J Clin Pathol.* 2013, 139, 2 137-139.
28. Cohen M.H., Farrell A., Justice R., Pazdur R.: Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Oncologist* 2009, 14, 2, 174-180.
29. Custodio A., Feliu J.: Prognostic and predictive biomarkers for epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer: Beyond KRAS mutations. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013, 85, 1, 45-81.
30. Day F.L., Jorissen R.N., Lipton L., Mouradov D., Sakthianandeswaren A., Christie M., Li S., Tsui C., Tie J., Desai J., Xu Z.Z., Molloy P., Whitehall V., Leggett B.A., Jones I.T., McLaughlin S., Ward R.L., Hawkins N.J., Ruzskiewicz A.R., Moore J., Busam D., Zhao Q., Strausberg R.L., Gibbs P., Sieber O.M.: PIK3CA and PTEN gene and exon mutation-specific clinicopathologic and molecular associations in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2013, 19, 12, 3285-3296.
31. De Roock W., Claes B., Bernasconi D., De Schutter J., Biesmans B., Fountzilas G., Kalogeras K.T., Kotoula V., Papamichael D., Laurent-Puig P., Penault-Llorca F., Rougier P., Vincenzi B., Santini D., Tonini G., Cappuzzo F., Frattini M., Molinari F., Saletti P., De Dosso S., Martini M., Bardelli A., Siena S., Sartore-Bianchi A., Tabernero J., Macarulla T., Di Fiore F., Gangloff A.O., Ciardiello F., Pfeiffer P., Qvortrup C., Hansen T.P., Van Cutsem E., Piessevaux H., Lambrechts D., Delorenzi M., Tejpar S.: Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010, 11, 8, 753-762.
32. Dela Cruz C.S., Tanoue L.T., Matthay R.A.: Lung Cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med.* 2011, 32, 4, 605-44.
33. Duan J., Zhang J.G., Deng H.W., Wang Y.P.: Comparative studies of copy number variation detection methods for next-generation sequencing technologies. *Plos One.* 2013, 8, 3, e59128-e59128.
34. Dziadziuszko R., Wynes M.W., Singh S., Asuncion B.R., Ranger-Moore J., Konopa K., Rzyman W., Szostakiewicz B., Jassem J., Hirsch F.R.: Correlation between MET gene copy number by silver in situ

- hybridization and protein expression by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012, 7, 2, 340-347.
35. D'haene B., Vandesompele J., Hellemans J.: Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods.* 2010, 50, 4, 262-270.
36. Edge S., Byrd D.R., Compton C.C., Fritz A.G., Greene F.L., Trotti A.: *AJCC Cancer Staging Handbook.* Nowy Jork: Springer-Verlag, 2009. ISBN 978-0-387-88440-0.
37. Engelman J.A., Luo J., Cantley L.C.: The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006, 7, 8, 606-619.
38. Firoozinia M., Moghadamtousi S.Z., Nikzad S., Abdul Kadir H.: PIK3CA gene amplification and PI3K p110 α protein expression in breast carcinoma. *Int J Med Sci.* 2014, 11, 6, 620-625.
39. Fury M.G., Hyman D.M., Snyder A.E., Gerecitano J.F., Voss M.H., Ho A.L., Konner J., Winkelmann J.L., Stasi M.A., Monson K.R., Iasonos A., Spriggs D.R., Bialer P., Lacouture M.E., Teitcher J.B., Katabi N., Fury M.G.: Parallel phase Ib studies of two schedules of buparlisib (BKM120) plus carboplatin and paclitaxel (q21 days or q28 days) for patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015, 75, 4, 747-755.
40. Gadgeel S.M., Wozniak A.: Preclinical rationale for PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors as therapy for epidermal growth factor receptor inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2013, 14, 4, 322-332.
41. Gallardo A., Lerma E., Muñoz J., Tibau A., Ojeda B., Barnadas A., Adrover E., Sánchez-Tejada L., Giner D., Ortiz-Martínez F., Peiró G.: Increased signalling of EGFR and IGF1R, and deregulation of PTEN/PI3K/Akt pathway are related with trastuzumab resistance in HER2 breast carcinomas. *Br J Cancer.* 2012, 106, 8, 1367-1373.
42. Garcia-Dios D.A., Lambrechts D., Coenegrachts L., Vandenput I., Capoen A., Webb P.M., Ferguson K.; ANECS (Australian National Endometrial Cancer Study Group), Akslen L.A., Claes B., Vergote I., Moerman P., Van Robays J., Marcickiewicz J., Salvesen H.B., Spurdle A.B., Amant F.: High-throughput interrogation of PIK3CA, PTEN,

- KRAS, FBXW7 and TP53 mutations in primary endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2013, 128, 2, 327-334.
43. Goldstraw P., Asamura H., Bunn P., Crowley J., Jett J., Rami-Porta R., Rusch V., Sobin L.: International Association For The Study of Lung Cancer staging manual in thoracic oncology. Orange Park: Editorial Rx Press, 2009. ISBN 978-0-9799274-4-7.
 44. Gonzalez-Angulo A.M., Chen H., Karuturi M.S., Chavez-MacGregor M., Tsavachidis S., Meric-Bernstam F., Do K.A., Hortobagyi G.N., Thompson P.A., Mills G.B., Bondy M.L., Blumenschein G.R.: Frequency of mesenchymal-epithelial transition factor gene (MET) and the catalytic subunit of phosphoinositide-3-kinase (PIK3CA) copy number elevation and correlation with outcome in patients with early stage breast cancer. *Cancer* 2013, 119, 1, 7-15.
 45. Gonzalez-Angulo A.M., Ferrer-Lozano J., Stemke-Hale K., Sahin A., Liu S., Barrera J.A., Burgues O., Lluch A.M., Chen H., Hortobagyi G.N., Mills G.B., Meric-Bernstam F.: PI3K pathway mutations and PTEN levels in primary and metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2011, 10, 6, 1093-1101.
 46. Gridelli C., Peters S., Sgambato A., Casaluce F., Adjei A.A., Ciardiello F.: ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat Rev.* 2014, 40, 2, 300-306.
 47. Haab B.B.: Antibody arrays in cancer research. *Mol Cell Proteomics.* 2005, 4, 4, 377-383.
 48. Hafsi S., Pezzino F.M., Candido S., Ligresti G., Spandidos D.A., Souza Z., McCubrey J.A., Travalì S., Libra M.: Gene alterations in the PI3K/PTEN/AKT pathway as a mechanism of drug-resistance (review). *Int J Oncol.* 2012, 40, 3, 639-644.
 49. Hayes M.P., Wang H., Espinal-Witter R., Douglas W., Solomon G.J., Baker S.J., Ellenson L.H.: PIK3CA and PTEN mutations in uterine endometrioid carcinoma and complex atypical hyperplasia. *Clin Cancer Res.* 2006, 15, 12, 5932-5935.
 50. He Y., Van't Veer L.J., Mikolajewska-Hanclìch I., van Velthuysen M.L., Zeestraten E.C., Nagtegaal I.D., van de Velde C.J., Marijnen C.A.: PIK3CA mutations predict local recurrences in rectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2009, 15, 22, 6956-6962.

-
51. Heist R.S., Sequist L.V., Engelman J.A.: Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J Thorac Oncol.* 2012, 7, 5, 924-933.
 52. Hernandez-Aya L.F., Gonzalez-Angulo A.M.: Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *Oncologist* 2011, 16, 4, 404-414.
 53. Hirsch F.R., Dziadziuszko R., Thatcher N., Mann H., Watkins C., Parums D.V., Speake G., Holloway B., Bunn P.A. Jr, Franklin W.A.: Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: comparison of antibodies and cutoff points to predict benefit from gefitinib in a phase 3 placebo-controlled study in advanced nonsmall-cell lung cancer. *Cancer* 2008, 112, 5, 1114-1121.
 54. Hong D.S., Falchook G.S., George G.C., Messersmith W.A., George G.C., O'Bryant C.L., Vo A.C., Klucher K., Herbst R.S., Eckhardt S.G., Peterson S., Hausman D.F., Kurzrock R., Jimeno A.: A multicenter phase I trial of PX-866, an oral irreversible phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2012, 18, 15, 4173-4182.
 55. Hwang C.C., Pintye M., Chang L.C., Chen H.Y., Yeh K.Y., Chein H.P., Lee N., Chen J.R.: Dual-colour chromogenic in-situ hybridization is a potential alternative to fluorescence in-situ hybridization in HER2 testing. *Histopathology* 2011, 59, 5, 984-992.
 56. Janku F., Tsimberidou A.M., Garrido-Laguna I., Wang X., Luthra R., Hong D.S., Naing A., Falchook G.S., Moroney J.W., Piha-Paul S.A., Wheler J.J., Moulder S.L., Fu S., Kurzrock R.: PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2011, 10, 3, 558-565.
 57. Janku F., Wheler J.J., Naing A., Falchook G.S., Hong D.S., Stepanek V.M., Fu S., Piha-Paul S.A., Lee J.J., Luthra R., Tsimberidou A.M., Kurzrock R.: PIK3CA mutation H1047R is associated with response to PI3K/AKT/mTOR signaling pathway inhibitors in early-phase clinical trials. *Cancer Res.* 2013, 73, 1, 276-284.
 58. Je E.M., An C.H., Yoo N.J., Lee S.H.: Mutational analysis of PIK3CA, JAK2, BRAF, FOXL2, IDH1, AKT1 and EZH2 oncogenes in sarcomas. *APMIS.* 2012, 120, 8, 635-639.
 59. Jehan Z., Bavi P., Sultana M., Abubaker J., Bu R., Hussain A., Alsbeih G., Al-Sanea N., Abduljabbar A., Ashari L.H., Alhomoud S., Al-Dayel

- F., Uddin S., Al-Kuraya K.S.: Frequent PIK3CA gene amplification and its clinical significance in colorectal cancer. *J Pathol.* 2009, 219, 3, 337-346.
60. Ji M., Guan H., Gao C., Shi B., Hou P.: Highly frequent promoter methylation and PIK3CA amplification in non-small cell lung cancer (NSCLC). *BMC Cancer.* 2011, 11, 147.
61. Jiang B.H., Liu L.Z.: PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 2009, 102, 19-65.
62. Jimeno A., Bauman J.E., Weissman C., Adkins D., Schnadig I., Beauregard P., Bowles D.W., Spira A., Levy B., Seetharamu N., Hausman D., Walker L., Rudin C.M., Shirai K.: A randomized, phase 2 trial of docetaxel with or without PX-866, an irreversible oral phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with relapsed or metastatic head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol.* 2015, 51, 4, 383-388.
63. Juric D., Baselga J.: Tumor genetic testing for patient selection in phase I clinical trials: the case of PI3K inhibitors.: *J Clin Oncol.* 2012, 30, 8 765-766.
64. Kalinsky K., Jacks L.M., Heguy A., Patil S., Drobnjak M., Bhanot U.K., Hedvat C.V., Traina T.A., Solit D., Gerald W., Moynahan M.E.: PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009, 15, 16, 5049-5059.
65. Kang S.Y., Bader A.G., Vogt P.K.: Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, 102, 3, 802-807.
66. Kato S., Iida S., Higuchi T., Ishikawa T., Takagi Y., Yasuno M., Enomoto M., Uetake H., Sugihara K.: PIK3CA mutation is predictive of poor survival in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2007, 121, 8, 1771-1778.
67. Kononen J., Bubendorf L., Kallioniemi A., Bärklund M., Schraml P., Leighton S., Torhorst J., Mihatsch M.J., Sauter G., Kallioniemi O.P.: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat med.* 1998, 4, 7, 844-847.
68. Konopka B., Janiec-Jankowska A., Kwiatkowska E., Najmoła U., Bidziński M., Olszewski W., Goluda C.: PIK3CA mutations and

- amplification in endometrioid endometrial carcinomas: relation to other genetic defects and clinicopathologic status of the tumors. *Hum Pathol.* 2011, 42, 11, 1710-1719.
69. Krasilnikov M.A.: Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry* 2000, 65, 1, 59-67.
70. Kuhn E., Wu R.C., Guan B., Wu G., Zhang J., Wang Y., Song L., Yuan X., Wei L., Roden R.B., Kuo K.T., Nakayama K., Clarke B., Shaw P., Olvera N., Kurman R.J., Levine D.A., Wang T.L., Shih IeM.: Identification of molecular pathway aberrations in uterine serous carcinoma by genome-wide analyses. *J Natl Cancer Inst.* 2012, 104, 19, 1503-1513.
71. Lee J., van Hummelen P., Go C., Palescandolo E., Jang J., Park H.Y., Kang S.Y., Park J.O., Kang W.K., MacConaill L., Kim K.M.: High-throughput mutation profiling identifies frequent somatic mutations in advanced gastric adenocarcinoma. *PLoS ONE.* 2012, 7, 6, e38892.
72. Levy B., Becker D., Spira A., Evans T., Schnadig I., Camidge D.R., Bauman J.E., Hausman D., Walker L., Nemunaitis J., Rudin C.M., Halmos B., Bowles D.W.: A randomized, phase 2 trial of docetaxel with or without PX-866, an irreversible oral phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, in patients with relapsed or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Thor Oncol.* 2014, 9, 7, 1031-1035.
73. Li T., Kung H.J., Mack P.C., Gandara D.R.: Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies. *J Clin Oncol.* 2013, 31, 8, 1039-1049.
74. Liao X., Morikawa T., Lochhead P., Imamura Y., Kuchiba A., Yamauchi M., Nosho K., Qian Z.R., Nishihara R., Meyerhardt J.A., Fuchs C.S., Ogino S.: Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. *Clin Cancer Res.* 2012, 18, 8 2257-2268.
75. Ligresti G., Militello L., Steelman L.S., Cavallaro A., Basile F., Nicoletti F., Stivala F., McCubrey J.A., Libra M.: PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle* 2009, 8, 9, 1352-1358.
76. Lim S.J., Cantillep A., Carpenter P.M.: Validation and workflow optimization of human epidermal growth factor receptor 2 testing using

- INFORM HER2 dual-color in situ hybridization. *Hum Pathol.* 2013, 44, 11, 2590-2596.
77. Lin X., Böhle A.S., Dohrmann P., Leuschner I., Schulz A., Kremer B., Fändrich F.: Overexpression of phosphatidylinositol 3-kinase in human lung cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2001, 386, 4, 293-301.
78. Liu J.F., Zhou X.K., Chen J.H., Yi G., Chen H.G., Ba M.C., Lin S.Q., Qi Y.C.: Up-regulation of PIK3CA promotes metastasis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2010, 16, 39, 4986-4991.
79. Liu Y.R., Jiang Y.Z., Zuo W.J., Yu K.D., Shao Z.M.: PIK3CA mutations define favorable prognostic biomarkers in operable breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2014, 7, 543-552.
80. Lockwood W.W., Chari R., Chi B., Lam W.L.: Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. *Eur J Hum Genet.* 2006, 14, 2, 139-148.
81. Ludovini V., Bianconi F., Pistola L., Chiari R., Minotti V., Colella R., Giuffrida D., Tofanetti F.R., Siggillino A., Flacco A., Baldelli E., Iacono D., Mameli M.G., Cavaliere A., Crinò L.: Phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha and KRAS mutations are important predictors of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011, 6, 4, 707-715.
82. Macheta A., Chocholska S., Podhorecka M.: Metody genetyczne w diagnostyce hematologicznej. *Postepy Hig Med Dosw.* 2015, 69, 475-487.
83. Maeng C.H., Lee J., van Hummelen P., Park S.H., Palescandolo E., Jang J., Park H.Y., Kang S.Y., MacConaill L., Kim K.M., Shim Y.M.: High-throughput genotyping in metastatic esophageal squamous cell carcinoma identifies phosphoinositide-3-kinase and braf mutations. *PLoS ONE.* 2012, 7, 8, e41655.
84. Manceau G., Marisa L., Boige V., Duval A., Gaub M.P., Milano G., Selves J., Olschwang S., Jooste V., le Legrain M., Lecorre D., Guenot D., Etienne-Grimaldi M.C., Kirzin S., Martin L., Lepage C., Bouvier A.M., Laurent-Puig P.: PIK3CA mutations predict recurrence in localized microsatellite stable colon cancer. *Cancer Med.* 2015, 4, 3, 371-382.

-
85. Mansfield A.S., Sukov W.R., Eckel-Passow J.E., Sakai Y., Walsh F.J., Lonzo M., Wiktor A.E., Dogan A., Jenkins R.B.: Comparison of fluorescence in situ hybridization (FISH) and dual-ISH (DISH) in the determination of her2 status in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2013, 139, 2, 144-150.
 86. Mao C., Yang Z.Y., Hu X.F., Chen Q., Tang J.L.: PIK3CA exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.* 2012, 23, 6, 1518-1525.
 87. Martini M., Ciraolo E., Gulluni F., Hirsch E.: Targeting PI3K in cancer: any good news? *Front Oncol.* 2013, 8, 3, 108.
 88. Massion P.P., Kuo W.L., Stokoe D., Olshen A.B., Treseler P.A., Chin K., Chen C., Polikoff D., Jain A.N., Pinkel D., Albertson D.G., Jablons D.M., Gray J.W.: Genomic copy number analysis of non-small cell lung cancer using array comparative genomic hybridization: implications of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Cancer Res.* 2002, 62, 13, 3636-3640.
 89. Mayer I.A., Abramson V.G., Isakoff S.J., Forero A., Balko J.M., Kuba M.G., Sanders M.E., Yap J.T., Van den Abbeele A.D., Li Y., Cantley L.C., Winer E., Arteaga C.L.: Stand up to cancer phase Ib study of pan-phosphoinositide-3-kinase inhibitor buparlisib with letrozole in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2014, 32, 12, 1202-1209.
 90. Mayr D., Heim S., Weyrauch K., Zeindl-Eberhart E., Kunz A., Engel J., Kirchner T.: Chromogenic in situ hybridization for Her-2/neu-oncogene in breast cancer: comparison of a new dual-colour chromogenic in situ hybridization with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Histopathology* 2009, 55, 6, 716-723.
 91. Metzner B., Barbisch M., Bachmann F., Czech W., Norgauer J.: Evidence of the involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in the migration, actin stress fiber formation, and alpha v beta 3-integrin-mediated adherence of human melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 1996, 107, 4, 597-602.
 92. Miron A., Varadi M., Carrasco D., Li H., Luongo L., Kim H.J., Park S.Y., Cho E.Y., Lewis G., Kehoe S., Iglehart J.D., Dillon D., Allred D.C., Macconail L., Gelman R., Polyak K.: PIK3CA mutations in in

- situ and invasive breast carcinomas. *Cancer Res.* 2010, 70, 14, 5674-5678.
93. Miyaki M., Lijima T., Yamaguchi T., Takahashi K., Matsumoto H., Yasutome M., Funata N., Mori T.: Mutations of the PIK3CA gene in hereditary colorectal cancers. *Int J Cancer.* 2007, 121, 7, 1627-1630.
 94. O'Brien C., Wallin J.J., Sampath D., GuhaThakurta D., Savage H., Punnoose E.A., Guan J., Berry L., Prior W.W., Amler L.C., Belvin M., Friedman L.S., Lackner M.R.: Predictive biomarkers of sensitivity to the phosphatidylinositol 3' kinase inhibitor GDC-0941 in breast cancer preclinical models. *Clin Cancer Res.* 2010, 16, 14, 3670-3683.
 95. Oda K., Stokoe D., Taketani Y., McCormick F.: High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Res.* 2005, 65, 23, 10669-10673.
 96. Ogino S., Liao X., Chan A.T.: Aspirin, PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival. *N Engl J Med.* 2013, 368, 3, 289-290.
 97. Ogino S., Nosho K., Kirkner G.J., Shima K., Irahara N., Kure S., Chan A.T., Engelman J.A., Kraft P., Cantley L.C., Giovannucci E.L., Fuchs C.S.: PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol.* 2009, 27, 9, 1477-1484.
 98. Okudela K., Suzuki M., Kageyama S., Bunai T., Nagura K., Igarashi H., Takamochi K., Suzuki K., Yamada T., Niwa H., Ohashi R., Ogawa H., Mori H., Kitamura H., Kaneko T., Tsuneyoshi T., Sugimura H.: PIK3CA mutation and amplification in human lung cancer. *Pathol Int.* 2007, 57, 10, 664-671.
 99. Paesmans M.: Prognostic and predictive factors for lung cancer. *Breathe* 2012, 9, 2, 113-122.
 100. Pang B., Cheng S., Sun S.P., An C., Liu Z.Y., Feng X., Liu G.J.: Prognostic role of PIK3CA mutations and their association with hormone receptor expression in breast cancer: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2014, 4, 6255.
 101. Perez-Tenorio G., Alkhori L., Olsson B., Waltersson M.A., Nordenskjöld B., Rutqvist L.E., Skoog L., Stål O.: PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not

- mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2007, 13, 12, 3577-3584.
102. Pileri S.A., Roncador G., Ceccarelli C., Piccioli M., Briskomatis A., Sabattini E., Ascani S., Santini D., Piccaluga P.P., Leone O., Damiani S., Ercolessi C., Sandri F., Pieri F., Leoncini L., Falini B.: Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol.* 1997, 183, 1, 116-123.
103. Pinto A.C., Ades F., de Azambuja E., Piccart-Gebhart M.: Trastuzumab for patients with HER2 positive breast cancer: delivery, duration and combination therapies. *Breast* 2013, 22, 2, S152-S155.
104. Pirker R., Pereira J.R., von Pawel J., Krzakowski M., Ramlau R., Park K., de Marinis F., Eberhardt W.E., Paz-Ares L., Störkel S., Schumacher K.M., von Heydebreck A., Celik I., O'Byrne K.J.: EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol.* 2012, 13, 1, 33-42.
105. Psyrri A., Papageorgiou S., Liakata E., Scorilas A., Rontogianni D., Kontos C.K., Argyriou P., Pectasides D., Harhalakis N., Pappa V., Kolialexi A., Economopoulou C., Kontsioti F., Maratou E., Dimitriadis G., Economopoulou P., Economopoulos T.: Phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit α gene amplification contributes to the pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2009, 15, 18, 5724-5732.
106. Rekhtman N., Paik P.K., Arcila M.E., Tafe L.J., Oxnard G.R., Moreira A.L., Travis W.D., Zakowski M.F., Kris M.G., Ladanyi M.: Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clin Cancer Res.* 2012, 18, 4, 1167-1176.
107. Rothschild S.I., Gautschi O.: Crizotinib in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2013, 14, 5, 473-480.
108. Roviello G.: The distinctive nature of adenocarcinoma of the lung. *Oncotargets Ther.* 2015, 2, 8, 2399-2406.
109. Saal L.H., Holm K., Maurer M., Memeo L., Su T., Wang X., Yu J.S., Malmström P.O., Mansukhani M., Enoksson J., Hibshoosh H., Borg A., Parsons R.: PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node

- metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 2005, 65, 7, 2554-2559.
110. Salama J.K., Vokes E.E.: New radiotherapy and chemoradiotherapy approaches for non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2013, 31, 8, 1029-1038.
 111. Samuels Y., Diaz L.A., Schmidt-Kittler O., Cummins J.M., DeLong L., Cheong I., Rago C., Huso D.L., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B., Velculescu V.E.: Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell.* 2005, 7, 6, 561-573.
 112. Samuels Y., Velculescu V.E.: Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* 2004, 3, 10, 1221-1224.
 113. Samuels Y., Waldman T.: Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010, 347, 21-41.
 114. Samuels Y., Wang Z.H., Bardelli A., Silliman N., Ptak J., Szabo S., Yan H., Gazdar A., Powell S.M., Riggins G.J., Willson J.K., Markowitz S., Kinzler K.W., Vogelstein B., Velculescu V.E.: High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004, 304, 5670, 554
 115. Sarker D., Ang J.E., Baird R., Kristeleit R., Shah K., Moreno V., Clarke P.A., Raynaud F.I., Levy G., Ware J.A., Mazina K., Lin R., Wu J., Fredrickson J., Spoerke J.M., Lackner M.R., Yan Y., Friedman L.S., Kaye S.B., Derynck M.K., Workman P., de Bono J.S.: First-in-human phase I study of pictilisib (GDC-0941), a potent pan-class I phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2015; 21, 1, 77-86.
 116. Sartore-Bianchi A, Martini M., Molinari F., Veronese S., Nichelatti M., Artale S., Di Nicolantonio F., Saletti P., De Dosso S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A.: PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 2009, 69, 5, 1851-1857.
 117. Saura C., Bendell J., Jerusalem G., Su S., Ru Q., De Buck S., Mills D., Ruquet S., Bosch A., Urruticoechea A., Beck J.T., Di Tomaso E., Sternberg D.W., Massacesi C., Hirawat S., Dirix L., Baselga J.: Phase Ib study of buparlisib plus trastuzumab in patients with HER2-positive advanced or metastatic breast cancer that has progressed on trastuzumab-based therapy. *Clin Cancer Res.* 2014; 20, 7, 1935-1945.

118. Shapiro G.I., Rodon J., Bedell C., Kwak E.L., Baselga J., Braña I., Pandya S.S., Scheffold C., Laird A.D., Nguyen L.T., Xu Y., Egile C., Edelman G.: Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of SAR245408 (XL147), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2014, 20, 1, 233-245.
119. Sharma S., Kelly T.K., Jones P.A.: Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010, 31, 1, 27-36.
120. Shayesteh L., Lu Y.L., Kuo W.L., Baldocchi R., Godfrey T., Collins C., Pinkel D., Powell B., Mills G.B., Gray J.W.: PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet.* 1999, 21, 1, 99-102.
121. Shi J., Liu W., Wang N., Lv H., Zhang G., Ji M., Xu L., He N., Shi B., Hou P.: Highly frequent PIK3CA amplification is associated with poor prognosis in gastric cancer. *BMC Cancer.* 2012, 12, 50.
122. Sood A., McClain D., Maitra R., Basu-Mallick A., Seetharam R., Kaubisch A., Rajdev L., Mariadason J.M., Tanaka K., Goel S.: PTEN gene expression and mutations in the PIK3CA gene as predictors of clinical benefit to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2012, 11, 1, 143-150.
123. Spoerke J.M., O'Brien C., Huw L., Koeppen H., Fridlyand J., Brachmann R.K., Haverty P.M., Pandita A., Mohan S., Sampath D., Friedman L.S., Ross L., Hampton G.M., Amler L.C., Shames D.S., Lackner M.R.: Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway alterations are associated with histologic subtypes and are predictive of sensitivity to PI3K inhibitors in lung cancer preclinical models. *Clin Cancer Res.* 2012, 18, 24, 6771-6783.
124. Stemke-Hale K., Gonzalez-Angulo A.M., Lluch A., Neve R.M., Kuo W.L., Davies M., Carey M., Hu Z., Guan Y., Sahin A., Symmans W.F., Pusztai L., Nolden L.K., Horlings H., Berns K., Hung M.C., van de Vijver M.J., Valero V., Gray J.W., Bernards R., Mills G.B., Hennessy B.T.: Integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res.* 2008, 68, 15, 6084-6091.
125. Studzińska A., Tyburski J., Dąca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategię monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia* 2008, 1, 80, 71-85.

126. Stuppia L, Antonucci I, Palka G., Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci.* 2012, 13, 3, 3245-3276.
127. Suda T., Hama T., Kondo S., Yuza Y., Yoshikawa M., Urashima M., Kato T., Moriyama H.: Copy number amplification of the PIK3CA gene is associated with poor prognosis in non-lymph node metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2012, 20, 12, 416-416.
128. Sugimoto Y., Whitman M., Cantley L.C., Erikson R.L.: Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984, 81, 7, 2117-2121.
129. Sun M., Hillmann P., Hofmann B.T., Hart J.R., Vogt P.K.: Cancer-derived mutations in the regulatory subunit p85 alpha of phosphoinositide 3-kinase function through the catalytic subunit p110 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010, 107, 35, 15547-15552.
130. Tanaka H., Yoshida M., Tanimura H., Fujii T., Sakata K., Tachibana Y., Ohwada J., Ebiiike H., Kuramoto S., Morita K., Yoshimura Y., Yamazaki T., Ishii N., Kondoh O., Aoki Y.: The selective class I PI3K inhibitor CH5132799 targets human cancers harboring oncogenic PIK3CA mutations. *Clin Cancer Res.* 2011, 17, 10, 3272-3281.
131. Tanner M., Gancberg D., Di Leo A., Larsimont D., Rouas G., Piccart M.J., Isola J.: Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol.* 2000, 157, 5, 1467-1472.
132. Toru M.: PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer* 2015, 15, 7, 111-123.
133. Toschi L., Finocchiaro G., Nguyen T.T., Skokan M.C., Giordano L., Gianoncelli L., Perrino M., Siracusano L., Di Tommaso L., Infante M., Alloisio M., Roncalli M., Scorsetti M., Jänne P.A., Santoro A., Varela-Garcia M.: Increased SOX2 gene copy number is associated with FGFR1 and PIK3CA gene gain in non-small cell lung cancer and predicts improved survival in early stage disease. *PLoS ONE.* 2014, 9, 4, 1-7.

-
134. Travis W.D., Brambilla E., Rami-Porta R., Vallières E., Tsuboi M., Rusch V., Goldstraw P.: Visceral pleural invasion: pathologic criteria and use of elastic stains proposal for the 7th edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2008, 3, 12, 1384-1390.
 135. Travis W.D., Brambilla E., Riely G.J.: New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J Clin Oncol.* 2013, 31, 8, 992-1001.
 136. Travis W.D., Brambilla E., Burke A.P., Marx A., Nicholson A.G.: WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Fourth edition. Lyon: IARC Press, 2015. ISBN 97-892-8322-43-65.
 137. Travis W.D., Brambilla E., Müller-Hermelink H.K., Harris C.C.: Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Third edition. Lyon: IARC Press, 2004. ISBN 92-832-2418-3.
 138. Tsao M.S., Sakurada A., Cutz J.C., Zhu C.Q., Kamel-Reid S., Squire J., Lorimer I., Zhang T., Liu N., Daneshmand M., Marrano P., da Cunha Santos G., Lagarde A., Richardson F., Seymour L., Whitehead M., Ding K., Pater J., Shepherd F.A.: Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med.* 2005, 353, 2, 133-144.
 139. Vanhaesebroeck B., Alessi D.R.: The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J.* 2000, 346, 561-576.
 140. Velasco A., Bussaglia E., Pallares J., Dolcet X., Llobet D., Encinas M., Llecha N., Palacios J., Prat J., Matias-Guiu X.: PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations. *Hum Pathol.* 2006, 37, 11, 1465-1472.
 141. Velho S., Moutinho C., Cirnes L., Albuquerque C., Hamelin R., Schmitt F., Carneiro F., Oliveira C., Seruca R.: BRAF, KRAS and PIK3CA mutations in colorectal serrated polyps and cancer: primary or secondary genetic events in colorectal carcinogenesis? *BMC Cancer.* 2008, 8, 255.
 142. Velho S., Oliveira C., Ferreira A., Ferreira A.C., Suriano G., Schwartz S. Jr, Duval A., Carneiro F., Machado J.C., Hamelin R., Seruca R.: The prevalence of PIK3CA mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer.* 2005, 41, 11, 1649-1654.
 143. Vivanco I., Sawyers C.L.: The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2, 7, 489-501.

144. Vogel U.F., Bueltmann B.D.: Simple, inexpensive, and precise paraffin tissue microarrays constructed with a conventional microcompound table and a drill grinder. *Am J Clin Pathol.* 2006, 126, 3, 342-348.
145. Vogt P.K., Hart J.R., Gymnopoulos M., Jiang H., Kang S., Bader A.G., Zhao L., Denley A.: Phosphatidylinositol 3-kinase: the oncoprotein. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010, 347, 79-104.
146. Vosse B.A.H., Seelentag W., Bachmann A., Bosman F.T., Yan P.: Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the Avidin-Biotin complex system and the EnVision(+) system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007, 15, 1, 103-107.
147. Walker E.H., Perisic O., Ried C., Stephens L., Williams R.L.: Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* 1999, 402, 6759, 313-320.
148. Wang J., Chai Y.L., Wang T., Liu J.H., Dai P.G., Liu Z.: Genetic alterations of PIK3CA and tumor response in patients with locally advanced cervical squamous cell carcinoma treated with cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy. *Exp Mol Pathol.* 2015, 98, 3, 407-410.
149. Wang L., Hu H., Pan Y., Wang R., Li Y., Shen L., Yu Y., Li H., Cai D., Sun Y., Chen H.: PIK3CA mutations frequently coexist with EGFR/KRAS mutations in non-small cell lung cancer and suggest poor prognosis in EGFR/KRAS wildtype subgroup. *PLoS One.* 2014, 9, 2, e88291-e88291.
150. Wang L., Zhang Q., Zhang J., Sun S., Guo H., Jia Z., Wang B., Shao Z., Wang Z., Hu X.: PI3K pathway activation results in low efficacy of both trastuzumab and lapatinib. *BMC Cancer.* 2011, 11, 248.
151. Whitehall V.L.J., Rickman C., Bond C.E., Ramsnes I., Greco S.A., Umapathy A., McKeone D., Faleiro R.J., Buttenshaw R.L., Worthley D.L., Nayler S., Zhao Z.Z., Montgomery G.W., Mallitt K.A., Jass J.R., Matsubara N., Notohara K., Ishii T., Leggett B.A.: Oncogenic PIK3CA mutations in colorectal cancers and polyps. *Int J Cancer.* 2012, 131, 4, 813-820.
152. Woenckhaus J., Steger K., Werner E., Fenic I., Gamberdinger U., Dreyer T., Stahl U.: Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2002, 198, 3, 335-342.

153. Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński W.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2012 roku. Warszawa: Krajowy Rejestr Nowotworów, 2014. ISSN 0867-8251.
154. Wu G., Xing M., Mambo E., Huang X., Liu J., Guo Z., Chatterjee A., Goldenberg D., Gollin S.M., Sukumar S., Trink B., Sidransky D.: Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005, 7, 5, R609-R616.
155. Yamamoto H., Shigematsu H., Nomura M., Lockwood W.W., Sato M., Okumura N., Soh J., Suzuki M., Wistuba I.I., Fong K.M., Lee H., Toyooka S., Date H., Lam W.L., Minna J.D., Gazdar A.F.: PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res.* 2008, 68, 17, 6913-6921.
156. Yang Q., Shao Y., Shi J., Qu Y., Wu K., Dang S., Shi B., Hou P.: Concomitant PIK3CA amplification and RASSF1A or PAX6 hypermethylation predict worse survival in gastric cancer. *Clin Biochem.* 2014, 47, 1-2, 111-116.
157. Yap T.A., Bjerke L., Clarke P.A., Workman P.: Drugging PI3K in cancer: refining targets and therapeutic strategies. *Curr Opin Pharmacol.* 2015, 23, 98-107.
158. Youlten D.R., Cramb S.M., Baade P.D.: The international epidemiology of lung cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol.* 2008, 3, 8, 819-831.
159. Zhou J.X., Yang H., Deng Q., Gu X., He P., Lin Y., Zhao M., Jiang J., Chen H., Lin Y., Yin W., Mo L., He J.: Oncogenic driver mutations in patients with non-small-cell lung cancer at various clinical stages. *Ann Oncol.* 2013, 24, 5, 1319-1325.
160. Zhu Y.F., Yu B.H., Li D.L., Ke H.L., Guo X.Z., Xiao X.Y.: PI3K expression and PIK3CA mutations are related to colorectal cancer metastases. *World J Gastroenterol.* 2012, 18, 28, 3745-3751.

8. STRESZCZENIE

Rak płuca jest główną przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych w Polsce i na świecie. Około osiemdziesiąt pięć procent wszystkich nowotworów złośliwych płuca stanowi niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP). Odsetek 5-letnich przeżyć chorych na NDRP wynosi zaledwie około 14%.

Stosowane metody skojarzonego leczenia chirurgicznego, systemowego oraz radioterapii są wciąż niewystarczające. Dużym zainteresowaniem cieszą się badania wspierające rozwój terapii ukierunkowanych molekularnie. Obecnie znanych jest kilkanaście preparatów stosowanych w ramach terapii celowanych głównie u chorych na raka gruczołowego płuca. Jednym z nowych celów molekularnych jest podjednostka katalityczna α 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (*PIK3CA*), będąca kluczowym elementem ścieżki sygnałowej PI3K/AKT.

Zasadniczym celem niniejszej pracy była ocena ekspresji białka *PIK3CA* oraz analiza liczby kopii genu *PIK3CA* w wycinkach z guza pierwotnego chorych na NDRP, a także zależności między obiema badanymi cechami, danymi klinicznymi i patologicznymi oraz czasem przeżycia chorych po radykalnej resekcji NDRP. Dodatkowym celem była ocena metody CISH/SISH jako przydatnego narzędzia mogącego mieć zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej do oceny amplifikacji genów.

Grupę badaną stanowiło 208 chorych leczonych chirurgicznie z powodu NDRP w Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku w latach 2007-2010. Materiał do badań stanowiły bloki parafinowe zawierające wycinki z guzów pierwotnych, z których wykonano mikromacierze tkankowe.

Ocenę ekspresji białka *PIK3CA* wykonano z zastosowaniem pośredniej reakcji immunohistochemicznej posługując się do analizy odczynów wskaźnikiem H (zakres wyników 0-300). Liczbę kopii genu *PIK3CA* zbadano przy użyciu techniki podwójnej hybrydyzacji *in situ*, w której do wykrycia interesującej nas sekwencji nukleotydowej stosuje się sondy znakowane chromogenem i jonami srebra.

Wartość wskaźnika H była większa niż 10 w 120 (57,7%) przypadkach NDRP, zaś amplifikację genu *PIK3CA* zanotowano w 43 przypadkach (20,7%). Zarówno dodatnia ekspresja białka, jak i amplifikacja genu *PIK3CA* występują zdecydowanie częściej w raku płaskonabłonkowym. Spośród innych badanych cech klinicznych i patologicznych wykazano m.in. związek wysokiego poziomu białka *PIK3CA* ze średnicą guza ($p=0,037$), oraz liczby kopii genu *PIK3CA* z odsetkiem martwicy w guzie ($p<0,001$). Stwierdzono również korelację między immunohistochemiczną oceną ekspresji białka *PIK3CA* a liczbą kopii genu *PIK3CA* ($p=0,004$, $r=0,212$). Ani poziom białka p110 α , ani amplifikacja genu *PIK3CA* nie posiadają znaczenia rokowniczego u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuca.

Podsumowując, wysoki poziom białka i amplifikacja genu *PIK3CA* są częstym zjawiskiem obserwowanym w NDRP, w szczególności w raku płaskonabłonkowym. Oba parametry nie mają wartości prognostycznej, ale istnieje silny związek między badanymi cechami, co może być wykorzystane we wstępnej kwalifikacji chorych do leczenia inhibitorami PI3K. Ocena statusu białka PIK3CA metodą IHC oraz liczby kopii genu *PIK3CA* metodą dual-ISH stanowią cenne narzędzia diagnostyczne mogące mieć zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej.

9. SUMMARY

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide, with a 5-year survival probability of approximately 14%. Non-small-cell lung cancer (NSCLC) constitutes approximately 85% of all lung malignancies.

Recently, the therapeutic landscape of NSCLC has changed due to progress in understanding of cancer biology. Several cell signaling pathways and molecular biomarkers were described as a potential targets for treatment. Phosphatidylinositol-3-kinase catalytic subunit alpha isoform (PIK3CA) plays a crucial role in regulation of the PI3K/AKT pathway and might be a new predictive factor for treatment with novel agents targeting PI3K.

The main aim of present study was to analyze *PIK3CA* gene copy number and protein expression in primary tumors from surgically resected NSCLC patients. We also assessed the associations among these abnormalities, patient characteristics and survival.

The study included 208 NSCLC patients who underwent radical resection of primary tumor at the Department of Thoracic Surgery in Medical University of Gdańsk between 2007-2010. Study was performed on tissue microarrays constructed from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks, containing representative primary tumor regions.

Indirect immunohistochemical staining (IHC) for PIK3CA was determined according to semi-quantitative *H-score*, using 0-300 scale. *PIK3CA* gene copy number was analyzed using dual-*in situ* hybridisation (dual-ISH) where molecular probes are marked by chromogens and silver ions.

PIK3CA IHC *H-score* was above 10 in 120 (57.7%) cases and *PIK3CA* amplification, defined as *PIK3CA/CEP3* ratio ≥ 2 , was detected in 43 tumors (20.7%). PIK3CA *H-score* and PIK3CA gene copy number (GCN) were higher in squamous cell lung cancer ($p=0.016$, $p<0.001$, respectively). Additionally, high PIK3CA protein level was associated with tumor size ($p=0.037$), and *PIK3CA* GCN was associated with the extent of tumor necrosis ($p<0.001$). We found a significant correlation between PIK3CA protein level and *PIK3CA* GCN ($p=0.004$, $r=0.212$). There was no association of analyzed parameters with relapse free survival or overall survival.

Present study indicates that high PIK3CA expression and gene amplification are more frequent in squamous cell versus other NSCLC histologies, but neither is associated with prognosis. There is a significant correlation between PIK3CA immunohistochemical staining and GCN. The above prevalence data may be considered for selection of patients to targeted therapy trials with phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibitors.