



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE

lek. Bernardeta Chajnowska

**Związek wybranych markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej
z parametrami kliniczno-morfologicznymi, klasyfikacją molekularną
i rokowaniem u pacjentek z naciekającym rakiem piersi**

**Relation of the selected epithelial-mesenchymal transition markers with the
clinico-morphological parameters, molecular classification and prognosis
for patients with invasive breast cancer**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych
wykonana w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

Promotor

dr hab. n. med. Marek Masiuk

SZCZECIN 2022

Spis treści

| | |
|--|----|
| I. WYKAZ SKRÓTÓW | 4 |
| II. WSTĘP..... | 5 |
| II.1. Epidemiologia raka piersi | 5 |
| II.2. Czynniki zwiększonego ryzyka..... | 5 |
| II.3. Czynniki rokownicze w raku piersi | 6 |
| II.4. Klasyfikacja nowotworów piersi..... | 8 |
| II.5. Typy molekularne raków piersi..... | 11 |
| II.6. Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna (<i>epithelial mesenchymal transition, EMT</i>).. | 13 |
| II.7. Markery EMT | 15 |
| II.8. Rola EMT w tworzeniu przerzutów | 17 |
| III. CEL PRACY | 19 |
| IV. MATERIAŁ I METODY | 20 |
| IV.1. Charakterystyka grupy badanej | 20 |
| IV.2. Reakcje immunohistochemiczne | 23 |
| IV.3. Analiza obrazu mikroskopowego | 25 |
| IV.4. Analiza statystyczna | 25 |
| V. WYNIKI | 27 |
| V.1. Ekspresja markerów EMT a wiek pacjentek..... | 29 |
| V.2. Ekspresja markerów EMT a średnica guza | 29 |
| V.3. Ekspresja markerów EMT a stan węzłów chłonnych..... | 30 |
| V.4. Ekspresja markerów EMT a obecność przerzutów odległych | 32 |
| V.5. Ekspresja markerów EMT a typ histologiczny raka | 32 |
| V.6. Ekspresja markerów EMT a stopień histologicznej złośliwości raka piersi | 35 |
| V.7. Ekspresja markerów EMT a angioinwazja..... | 36 |
| V.8. Ekspresja markerów EMT a typ molekularny raka piersi | 36 |
| V.9. Ekspresja E-kadheryny a ER, PR, HER2, Ki67, CTH | 39 |
| V.10. Ekspresja N-kadheryny a ER, PR, HER2, Ki67, CTH..... | 40 |
| V.11. Ekspresja Slug a ER, PR, HER2, Ki67, CTH | 41 |
| V.12. Ekspresja Snail a ER, PR, HER2, Ki67, CTH | 42 |
| V.13. Ekspresja wimentyny a ER, PR, HER2, Ki67, CTH | 43 |
| VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW | 46 |
| VII. DYSKUSJA..... | 47 |
| VII.1. Znaczenie EMT | 47 |

| | |
|---|----|
| VII.2. Ekspresja EMT a parametry kliniczno-morfologiczne raków piersi | 48 |
| VII.3. Rola EMT w innych zmianach nowotworowych i nienowotworowych | 52 |
| VIII. WNIOSKI..... | 56 |
| IX. STRESZCZENIE..... | 57 |
| X. SUMMARY | 59 |
| XI. PIŚMIENNICTWO | 61 |
| XII. ANEKS | 70 |

I. WYKAZ SKRÓTÓW

- **BM** – *basement membrane* – błona podstawna
- **CTH** – *chemotherapy* – chemioterapia
- **DCIS** – *ductal carcinoma in situ* – rak śródprzewodowy
- **EGF** – *epidermal growth factor* – naskórkowy czynnik wzrostu
- **EGFR** – *epidermal growth factor receptor* – receptor naskórkowego czynnika wzrostu
- **EMT** – *epithelial mesenchymal transition* – przemiana nabłonkowo-mesenchymalna
- **ER** – *estrogen receptor* – receptor estrogenów
- **ET-1** – *endothelin-1* – endotelina 1
- **HCC** – *hepatocellular cancer* – rak wątrobowokomórkowy
- **HGF** – *hepatocyte growth factor* – czynnik wzrostu hepatocytów
- **IHC** – *immunohistochemistry* – immunohistochemia
- **MET** – *mesenchymal epithelial transition* – przemiana mezenchymalno-nabłonkowa
- **PR** – *progesteron receptor* – receptor progesteronu
- **SD** – *standard deviation* – odchylenie standardowe
- **SE** – *standard error* – błąd standardowy
- **TGF- β** – *transforming growth factor- β* – transformujący czynnik wzrostu β
- **TNBC** – *triple negative breast cancer* – rak potrójnie negatywny
- **TNF- α** – *tumor necrosis factor- α* – czynnik martwicy nowotworów α

II. WSTĘP

II.1. Epidemiologia raka piersi

W Polsce rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet, a współczynnik zachorowalności systematycznie rośnie [1,2,3]. Dla porównania w 1963 roku wynosił on 30,6/100 000 kobiet, a w 2015 roku 91,2/100 000. W 2015 roku zachorowania na raka piersi stanowiły w Polsce 22,2% ogółu zachorowań na nowotwory złośliwe u kobiet, zaś zgony z tego powodu wyniosły 14%. Ryzyko wystąpienia raka piersi rośnie wraz z wiekiem. Częstość występowania szybko zwiększa się po 30 roku życia. Najwięcej raków tego narządu występuje u kobiet między 50 i 69 rokiem życia, zaś szczyt zachorowań przypada na 60-64 rok życia. W roku 2013, w skali globalnej, raka piersi rozpoznano u ponad 1,8 miliona kobiet, a spośród nich zmarło 471 tysięcy [2]. Blisko 90% zgonów z powodu raka piersi wynika z obecności przerzutów [2,4,5,6,7,8]. Istnieje szereg czynników zwiększających ryzyko zachorowania na ten nowotwór.

II.2. Czynniki zwiększonego ryzyka

Rak piersi występuje głównie u kobiet, jest on około 100 razy częstszy niż u mężczyzn. Wczesna pierwsza miesiączka i późna menopauza wydłużają czas ekspozycji na estrogeny, przyczyniając się do wzrostu ryzyka wystąpienia raka piersi. Kobiety, które nie rodziły lub rodziły pierwsze dziecko po 30 roku życia również częściej chorują na raka piersi. Innymi czynnikami zwiększonego ryzyka są: otyłość, doustne środki antykoncepcyjne, używki, promieniowanie jonizujące, dieta wysokotłuszczowa i wysokobiałkowa, rasa biała [2,3]. Promieniowanie jonizujące obejmujące klatkę piersiową zwiększa ryzyko wystąpienia raka piersi jeśli ekspozycja wystąpi gdy piersi wciąż się rozwijają [3]. Otyłość po menopauzie, hormonalna terapia zastępcza i spożywanie alkoholu również są uważane za czynniki zwiększonego ryzyka [2,9].

Rak piersi jest klinicznie i patologicznie niejednorodną chorobą. Najwyższy wskaźnik zachorowania na raka piersi występuje u kobiet pochodzenia europejskiego. Afroamerykanki zapadają na raka piersi wcześniej, tj. przed 40 rokiem życia. W patogenezie tego nowotworu mają udział czynniki genetyczne, środowiskowe i hormonalne. Największe ryzyko

wystąpienia raka piersi dotyczy osób, u których tym nowotworem są dotknięci krewni pierwszego stopnia [3]. Wśród czynników genetycznych znaczącą rolę odgrywają geny *BRCA1* i *BRCA2*, chociaż raki z mutacją *BRCA1* stanowią mniejszy odsetek raków przewodowych niż raki sporadyczne. Rak piersi występuje także w rzadkich zespołach dziedzicznie uwarunkowanych predyspozycji do powstawania nowotworów, takich jak: zespół Li-Fraumeni, zespół Peutza-Jeghersa, zespół Nijmegen, niedokrwistość Fanconiego.

Uważa się, że najważniejszymi czynnikami wpływającymi na odsetek przeżyć kobiet z naciekającym rakiem piersi są: wielkość guza i obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachowych [2,3,10].

II.3. Czynniki rokownicze w raku piersi

Czynniki rokownicze dzieli się na dwie grupy: czynniki prognostyczne i czynniki predykcyjne [2]. Czynniki prognostyczne pozwalają na ocenę ryzyka wznowy lub zgonu u chorych, którzy nie zostali poddani systemowemu leczeniu uzupełniającemu. Czynniki predykcyjne zaś określają wrażliwość na zastosowane leczenie [2,3]. Do głównych czynników rokowniczych raka sutka zaliczamy:

- typ histologiczny raka
- rozmiary guza
- stan węzłów chłonnych pachowych
- indeks proliferacyjny
- stopień histologicznej złośliwości
- ploidię DNA
- ekspresję receptora estrogenów (ER) i progesteronu (PR)
- wiek chorej

Do typów histologicznych raka sutka mających lepsze rokowanie zaliczamy: raka cewkowego, raka śluzowego i raka brodawkowatego.

Rozmiary guza mają istotny wpływ na rokowanie. Ryzyko nawrotu choroby lub zgonu wzrasta wraz ze wzrostem średnicy guza [2]. Przy średnicy mniejszej niż 5 mm, prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia jest równe około 96%. Z kolei średnica guza większa niż 50 mm obniża tę wartość do 63%. Pacjentki bez przerzutów w węzłach chłonnych pachowych (pN0) i z guzami mniejszymi niż 10 mm (<pT1b), mają bardzo dobre

rokowanie. Im większa średnica guza tym większe prawdopodobieństwo przerzutów w węzłach chłonnych pachowych [2,3,10].

Stan węzłów chłonnych ma duże znaczenie rokownicze u pacjentek z rakiem piersi. Jest on brany pod uwagę przy podejmowaniu decyzji co do systemowego leczenia uzupełniającego. W materiale z resekcji zawartości dołu pachowego należy zbadać histologicznie co najmniej 10 węzłów chłonnych. Powinny one zostać skrojone seryjnie w całości, dodatkowo dla zwiększenia prawdopodobieństwa znalezienia komórek rakowych można wykorzystać odczyny immunohistochemiczne. Obecność przerzutów i naciekanie przez komórki rakowe torebki węzła pogarsza rokowanie. Biopsja węzła chłonnego wartowniczego jest standardem oceny zajęcia węzłów chłonnych. Większość przypadków chorych z rakiem sutka nie wykazuje obecności przerzutów w węzłach chłonnych pachowych (około 66% rozpoznanych raków sutka) [1,2,3].

Za pomocą przeciwciała MIB-1 można ocenić ekspresję białka Ki67 stanowiącą indeks proliferacyjny komórek rakowych. Jest on uważany za mocny czynnik rokowniczy. Stwierdzono związek między wysokim indeksem proliferacyjnym a złym rokowaniem. Ma on ścisły związek z prawdopodobieństwem przeżycia 5 lat zarówno w całej grupie pacjentek z inwazyjnym rakiem przewodowym jak i w grupach chorych bez przerzutów lub z przerzutami w węzłach chłonnych pachowych [2,10].

Stopień histologicznej złośliwości raka określa jego cechy fenotypowe. Jest bardzo ważnym elementem klasyfikacji takich jak m.in. *Nottingham Prognostic Index* umożliwiających podejmowanie decyzji klinicznych. Wysoki stopień złośliwości histologicznej (G3) wskazuje na gorsze rokowanie, niezależnie od chemioterapii czy hormonoterapii. Jednocześnie raki G3 są bardziej wrażliwe na chemioterapię [2,3].

Ploidia DNA, a więc zawartość DNA w jądrach komórek rakowych odgrywa również rolę w rokowaniu. Raki aneuploidalne, zawierające nieprawidłową ilość DNA (hipo- lub hiperdiploidalną) mają nieco gorsze rokowanie [2,3].

Większość raków sutka (około 50-85%) wykazuje ekspresję receptorów steroidowych. Guzy ER czy PR dodatnie mają lepsze rokowanie.

Młody wiek chorej jest czynnikiem złego rokowania, niezależnym od rozmiarów guza, stanu węzłów chłonnych, ekspresji ER czy stopnia histologicznej złośliwości. Jednakże chemioterapia daje lepsze rezultaty u młodych kobiet, natomiast tamoksyfen znacznie zmniejsza śmiertelność u kobiet po menopauzie [2,3,10].

Do pozostałych czynników rokowniczych należą m.in. molekularny typ raka, liczba naczyń krwionośnych włosowatych w obrębie guza, ekspresja EGFR (receptor naskórkowego czynnika wzrostu), stężenie selenu w surowicy krwi.

Molekularne typy raków sutka wyróżniane są w oparciu o ekspresję ER, PR, HER2 i Ki67. Raki luminalne A to zwykle raki inwazyjne przewodowe o niskim stopniu histologicznej złośliwości i niektóre typy histologiczne raków o dobrym rokowaniu (rak śluzowy, rak cewkowy, rak sitowaty). W przeciwieństwie do raków luminalnych A, raki luminalne B są zwykle rakami o wysokim stopniu złośliwości histologicznej (G3). Raki potrójnie negatywne mają najgorsze rokowanie.

Gęstość naczyń włosowatych w guzie i proliferacja komórek śródbłonna są regulowane przez różne mechanizmy. Angiogeneza stanowi cel nowych sposobów terapii umożliwiających skuteczne leczenie już we wczesnym etapie rozwoju raka sutka [2,3].

Ekspresja EGFR może mieć znaczenie predykcyjne. Ekspresja tego białka występuje w ponad 44% raków sutka z obecnością mutacji w genie *BRCA1* oraz w podobnym odsetku przypadków raków potrójnie negatywnych. W leczeniu można zastosować inhibitory EGFR tj. drobnocząsteczkowe inhibitory kinazy tyrozynowej i monoklonalne przeciwciała [2].

Poziom selenu przed leczeniem raka piersi ma związek z rokowaniem po leczeniu. Im wyższy poziom selenu tym lepsze rokowanie i wyższy odsetek 5-letnich przeżyć [2].

II.4. Klasyfikacja nowotworów piersi

Pod koniec 2019 roku opublikowana została przez WHO nowa klasyfikacja nowotworów piersi [11,12]. Wprowadzono dwie dodatkowe jednostki chorobowe, tj. torbielakogruczolakoraka śluzowego oraz raka wysokokomórkowego o odwróconej polaryzacji. Klasyfikacja WHO nabłonkowych guzów piersi obejmuje łagodne proliferacje nabłonkowe i ich prekursory, zmiany o charakterze gruczolistości i łagodne zmiany obejmujące gruczolaki, guzy nabłonkowo-mioepitelialne, nowotwory brodawkowate, nienaciekającą neoplazję zrazikową, raka przewodowego in situ, raki inwazyjne, raki neuroendokrynne oraz guzy rzadkie i guzy typu śliniankowego [12].

- raki nieinwazyjne:
 1. rak wewnątrzprzewodowy nienaciekający NOS (*ductal carcinoma in situ*)
 2. nieinwazyjna neoplazja zrazikowa (*non-invasive lobulare neoplasia*)

W najnowszej klasyfikacji zawarto również zmienioną ocenę mikroskopową raka przewodowego in situ.

- raki inwazyjne:
 1. rak przewodowy naciekający NOS (*infiltrating duct carcinoma NOS*)
 2. rak onkocytarny (*oncocytic carcinoma*)
 3. rak bogaty w lipidy (*lipid-rich carcinoma*)
 4. rak bogaty w glikogen (*glycogen-rich carcinoma*)
 5. rak łojowy (*sebaceous carcinoma*)
 6. rak zrazikowy NOS (*lobular carcinoma NOS*)
 7. rak cewkowy (*tubular carcinoma*)
 8. rak sitowaty NOS (*cribriform carcinoma NOS*)
 9. gruczolakorak śluzowy (*mucinous adenocarcinoma*)
 10. torbielakogruczolakorak śluzowy NOS (*mucinous cystadenocarcinoma NOS*)
 11. mikrobrodawkowaty rak inwazyjny piersi (*invasive micropapillary carcinoma of breast*)
 12. gruczolakorak apokrynowy (*apocrine adenocarcinoma*)
 13. rak metaplastyczny NOS (*metaplastic carcinoma NOS*)

Ponadto wyodrębniona została grupa nowotworów brodawkowatych, neuroendokrynych oraz rzadkich guzów i guzów typu śliniankowego tj.:

1. rak zrazikowokomórkowy (*acinar cell carcinoma*)
2. rak gruczołowo-torbielowaty (*adenoid cystic carcinoma*)
3. rak wydzielniczy (*secretory carcinoma*)
4. rak śluzowo-naskórkowy (*mucoepidermoid carcinoma*)
5. gruczolakorak wielopostaciowy (*polymorphous adenocarcinoma*)
6. rak wysokokomórkowy o odwróconej polaryzacji (*tall cell carcinoma with reversed polarity*)

W ocenie histopatologicznej guzów piersi najważniejszym jest różnicowanie raków nieinwazyjnych i inwazyjnych. Ma to ogromny wpływ na dalsze postępowanie jak i rokowanie u pacjentek.

W raku nieinwazyjnym komórki nowotworowe rosną w obrębie nabłonka przewodów lub wypełniają pęcherzyki gruczołowe i przewodniki końcowe zrazików. Wyróżniamy raki

przewodowe in situ (śródprzewodowe) oraz nieinwazyjną neoplazję zrazikową. Większość raków wykrytych w trakcie mammografii stanowią raki śródprzewodowe, jednak ponad 80% kobiet z rakami śródprzewodowymi nie ma zmian stwierdzonych klinicznie [2,3]. Raki te nie naciekają błony podstawnej nabłonka a przez to również otaczającego podścieliska. Często są to zmiany wielogniskowe zlokalizowane głównie w jednym sutku. Na ich podłożu może rozwinąć się rak inwazyjny. W tego typu rakach często występują mikrozwapnienia. Oprócz oceny histopatologicznej tych zmian, istotne jest, aby ocenić ekspresję ER w komórkach rakowych. Silna ekspresja odczyn obniża ryzyko wznowy lub progresji do raka inwazyjnego.

Nieinwazyjna neoplazja zrazikowa, jest zmianą niewyczuwalną palpacyjnie, zwykle wykrywaną przypadkowo. Jest to zazwyczaj zmiana obustronna i częściej występująca u kobiet przed menopauzą. Najważniejszymi cechami komórek w tej neoplazji są monomorfizm i dyskohezia, wynikająca z braku ekspresji E-kadheryny. Ponad 50% pęcherzyków gruczołowych i przewodzików w TDLU jest poszerzonych i wypełnionych przez populację komórek z dyskohezią [1,2,3].

Spośród raków inwazyjnych omówione zostały tu najczęstsze dwa typy, które badałam w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Inwazyjny rak przewodowy stanowi najczęstszy typ histologiczny naciekającego raka piersi, obejmując 75% raków piersi. Rakowi temu towarzyszy desmoplastyczna reakcja podścieliska i zastępowanie tkanki tłuszczowej tkanką łączną włóknistą. Makroskopowo raki te mają postać twardego guza o nieregularnym obrysie. Powierzchnia przekroju jest zwykle zaciągnięta z drobnymi ogniskami i pasmami o żółtawo-białawym zabarwieniu. Raki te wykazują w większości ekspresję receptorów ER i PR, a w około 1/3 nadekspresję HER2 [2,3].

Według klasyfikacji *SBR/Nottingham* raki przewodowe NOS dzieli się na trzy stopnie histologicznej złośliwości [2]. Klasyfikacja ta bierze pod uwagę takie cechy jak: tworzenie struktur przewodowych, stopień polimorfizmu jąder komórkowych oraz aktywność mitotyczną, każda z cech oceniana jest w punktach od 0 do 3 a łączna suma punktów może wynosić od 3 do 9. Wyróżnia się trzy stopnie złośliwości histologicznej: G1 (mały, od 3-5 punktów), G2 (średni, 6-7 punktów) i G3 (duży, 8-9 punktów) [2,3,10].

W raku zrazikowym inwazyjnym komórki rakowe tworzą pasma (*tzw. Indian files*). Komórki te często zawierają w cytoplazmie wodniczkę ze śluzem. Komórki raka zrazikowego są rozproszone w normalnym podścielisku, bez reakcji desmoplastycznej. Wszystkie warianty raka wykazują ujemny odczyn immunohistochemiczny na obecność E-kadheryny. Rak zrazikowy wykazuje ekspresję receptorów estrogenów i progesteronu, a nie wykazuje

nadekspresji HER2. Można wyróżnić następujące warianty raka zrazikowego: klasyczny, pleomorficzny, cewkowo-zrazikowy, pęcherzykowy, lity, mieszany [2,10].

Rak piersi daje przerzuty drogą naczyń limfatycznych do węzłów chłonnych oraz drogą naczyń krwionośnych głównie do płuc, kości, wątroby, nadnerczy, mózgu, opłucnej czy otrzewnej.

W raku zrazikowym przerzuty do płuc, wątroby i mózgu występują rzadziej niż w raku przewodowym. Z kolei rak zrazikowy ma większą skłonność do przerzutów do opon mózgowych, otrzewnej, przestrzeni zaotrzewnowej, przewodu pokarmowego, narządów płciowych czy kości [2,3,10].

II.5. Typy molekularne raków piersi

W każdym raporcie patomorfologicznym powinna być zawarta ocena ekspresji receptorów steroidowych (estrogenów, progesteronu), nadekspresji białka HER2 i indeksu proliferacyjnego Ki67. Parametry te mają duże znaczenie prognostyczne i predykcyjne [2,13]. W immunohistochemicznej ocenie ekspresji receptorów steroidowych określa się reakcję barwną w jądrach komórek raka, jej intensywność i odsetek dodatnich jąder komórkowych. Określenie nadekspresji białka HER2 jest bardziej złożone i obejmuje ocenę ekspresji w obrębie błony komórkowej. Wykorzystuje się czterostopniową skalę oceny reakcji barwnej: 0, +1, +2, +3. W przypadkach o niejednoznacznym stanie nadekspresji HER2 (+2) jako metoda weryfikacji zalecana jest hybrydyzacja in situ (FISH) [10,13].

Konferencja w St.Gallen w 2013 roku przyjęła jako surogat klasyfikacji molekularnej klasyfikację immunofenotypową, opierającą się na ocenie ekspresji ER, PR, HER2 i indeksu Ki67 [2,14].

Wyróżnia ona następujące typy raka:

1. Luminalny A: ER (+), PR (+), HER2 (-), Ki67 niski (<20%)
2. Luminalny B (HER2-): ER (+), HER2 (-) oraz przynajmniej: albo wysoki Ki67 (>20%), albo PR ujemny lub niski
3. Luminalny B (HER2+): ER (+), HER2 (+), jakikolwiek Ki67 i PR
4. HER2 (+), Nieluminalny: HER2 (+) PR (-), ER (-)
5. Potrójnie negatywny (*basal-like*): ER (-), PR (-), HER2 (-)

ER jest jądrowym czynnikiem transkrypcyjnym, który kontroluje rozwój i zróżnicowanie normalnych, hyperplastycznych i nowotworowych komórek gruczołu piersiowego. Ekspresja ER jest różna w raku przewodowym i zrazikowym [13]. Wyróżniamy dwa podtypy tego receptora: ER α kodowany przez gen *ESR1* oraz ER β kodowany przez gen *ESR2*. Około 75% inwazyjnych raków sutka wykazuje dodatni odczyn immunohistochemiczny na obecność receptora ER. Raki cewkowe, dobrze zróżnicowane raki przewodowe oraz klasyczne raki zrazikowe są prawie zawsze ER i PR pozytywne. Do raków sutka, które nie wykazują ekspresji receptora estrogenów zalicza się m.in. nisko zróżnicowane raki przewodowe, raki rdzeniaste, raki gruczołowo-torbielowate i raki wydzielnicze [2,9]. Guzy, które są ER pozytywne mają tendencję do przerzutów do kości, tkanek miękkich oraz układu moczowo-płciowego. Z kolei guzy ER negatywne częściej przerzutują do narządów wisceralnych i mózgu. Kobiety, u których rozpoznany nowotwór jest ER i PR pozytywny lepiej odpowiadają na terapię hormonalną.

ER odgrywa ważną rolę w regulowaniu proliferacji komórek nabłonka sutka, powstawaniu i różnicowaniu nowotworów. Wielu badaczy skupiło się na zrozumieniu korelacji pomiędzy utratą ekspresji ER i przemianą nabłonkowo-mezenchymalną (*EMT – epithelial mesenchymal transition*), inwazją i przerzutami w TNBC (*TNBC – triple negative breast cancer*) [7,9,14,15]. ER sprzyja wzrostowi pierwotnych nowotworów piersi, ale może również antagonizować szlaki sygnałowe, które prowadzą do EMT. Dowiedziono, iż brak ekspresji ER jest ściśle powiązany z bardziej złośliwym zachowaniem i gorszym przeżyciem u pacjentek z TNBC [15].

Raki luminalne B charakteryzuje niska ekspresja PR. Jest to ważny negatywny czynnik rokowniczy [9,13]. Raki PR(-) częściej występują u starszych chorych, są częściej aneuploidne i dużo częściej wykazują nadekspresję HER2. Ponadto cechuje je ograniczona odpowiedź na leczenie hormonalne [10,13].

HER2 jest onkogenem, który koduje transbłonową glikoproteinę o aktywności kinazy tyrozynowej. Zakłada się, że u chorych na raka piersi z nadekspresją białka HER2, zaburzenie onkogeny odpowiedzialnego za produkcję tego receptora błonowego, tj. amplifikacja genu *HER2* leży u podstaw karcinogenezy. Gen *HER2* (*NEU, ERBB-2*) jest zlokalizowany na chromosomie 17q21, a kodowana przez niego glikoproteina zbudowana z 1255 reszt aminokwasowych ma ciężar cząsteczkowy 185 kDa i określana jest symbolem p185 [9]. Nadekspresja białka HER2 spotykana jest częściej w rakach o niskim stopniu zróżnicowania histologicznego: w rakach przewodowych G3, w rakach śródprzewodowych, szczególnie cechujących się martwicą typu czopiastego oraz w chorobie Pageta piersi. W zrazikowych

rakach piersi w porównaniu z rakami przewodowymi, nadekspresję białka HER2 spotyka się względnie rzadko. W licznych badaniach wykazano ponadto, że w 70-80% przypadków raka piersi status receptora HER2 nie zmienia się w przebiegu choroby, jest taki sam w guzie pierwotnym, jak i w ogniskach przerzutów [10].

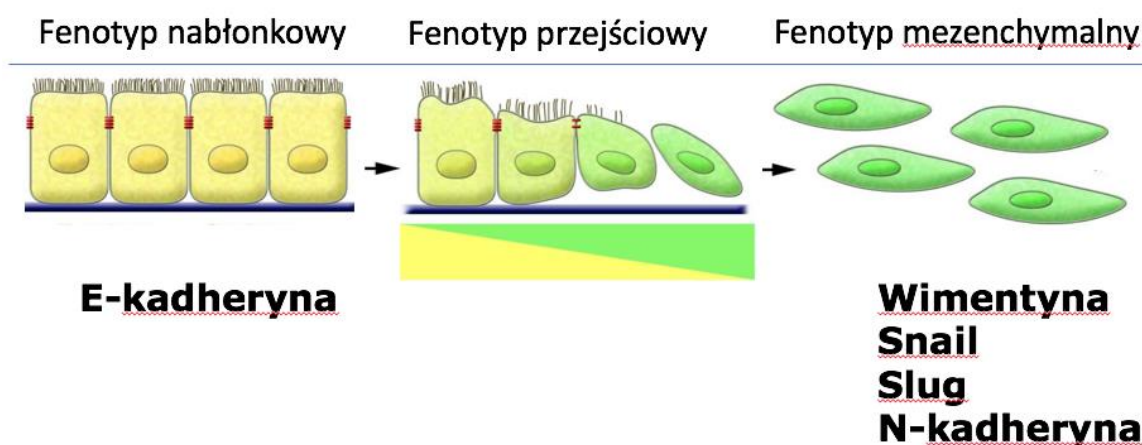
Ocena indeksu Ki67 w raku piersi stanowi istotny element w różnicowaniu typu luminalnego A od luminalnego B (HER2 minus). Przyjęto wartość $\leq 20\%$ jako granicę niskiego indeksu. Warto podkreślić, iż wysoki poziom Ki67 ma wartość rokowniczą, ale nie jest wskaźnikiem skuteczności terapii. Jest to więc czynnik prognostyczny, a nie predykcyjny [2].

II.6. Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna (*epithelial mesenchymal transition, EMT*)

Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna (EMT) jest procesem fizjologicznym, który również odgrywa rolę w tworzeniu przerzutów nowotworowych [16,17]. Komórki nabłonkowe i mezenchymalne biorą udział w prawidłowym rozwoju embrionalnym jak i w organogenezie. Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna jest programem komórkowym zaangażowanym w rozwój zarodkowy, gojenie się ran, zapalenie, włóknienie, ale także w proces nowotworzenia. EMT jest złożonym programem, w którym komórki nabłonkowe mogą uzyskać mezenchymalny fenotyp i ruchliwość poprzez kaskadę zdarzeń biologicznych [4,5,15].

W pewnych warunkach komórka nabłonkowa może prezentować fenotyp komórki mezenchymalnej. Dzięki temu zyskuje charakterystyczne dla niej cechy strukturalne i funkcjonalne [9,18,19].

EMT została po raz pierwszy opisana przez Elizabeth Hay w latach osiemdziesiątych XX wieku jako główny proces wczesnej morfogenezy embrionalnej [3,19]. Proces EMT zaczyna się od utraty połączeń obwódki zamykającej (*zona occludens*) i wymieszania szczytowych i bocznych elementów błony komórkowej. Komórka traci swoją polaryzację, zaś błona podstawna ulega degradacji. Dochodzi do zastąpienia białek powierzchniowych komórki nabłonkowej głównie E-kadheriney przez białka typowe dla komórki mezenchymalnej: N-kadheriney i wimentyne. Ostatecznie kształt komórki staje się wrzecionowaty. Zwiększa się jej mobilność. Możliwe jest przechodzenie komórki do miejsca docelowego [18,20,21].



Rys.1. Markery immunohistochemiczne EMT w zależności od fenotypu komórki (fenotyp EMT). Źródło: The basics of epithelial-mesenchymal transition [21].

Wyróżnić można trzy rodzaje programów EMT: typ 1 dotyczy embriogenezy, gastrulacji i tworzenia grzebienia nerwowego; typ 2 wiąże się z regeneracją tkanek i gojeniem się ran; typ 3 związany jest z chorobą nowotworową, inwazją i przerzutami [13,18,22,23]. EMT typu 1 odgrywa ważną rolę w implantacji zarodka, embriogenezie i rozwoju narządów [21,23]. W tym samym czasie, odwrotne przejście mezenchymalno-nabłonkowe (*MET – mesenchymal epithelial transition*) jest niezbędne do wytworzenia wtórnego nabłonka nerki i innych narządów. Wtórny nabłonek może pozostać niezmienny lub może zostać ponownie zróżnicowany do pierwotnych komórek pochodzenia nabłonkowego lub komórek mezenchymalnych takich jak fibroblasty, adipocyty, chondrocyty, osteoblasty czy komórki mięśniowe [14,15]. Proces EMT jest niezbędny do tworzenia komórek progenitorowych, np. pochodzących z nasierdza i ich migracji w przestrzeni podnasierdziowej [13,15]. EMT typu 2 opisana została nie tylko w fizjologii procesów naprawczych, ale także w procesie włóknienia w nerkach, płucach i wątrobie, a nawet w patogenezie przetok w chorobie Crohna [13,15].

Różne procesy biologiczne aktywują kaskadę, która prowadzi nie tylko do zmiany fenotypu od nabłonkowego do mezenchymalnego, ale pozwala na oderwanie komórek guza pierwotnego, ich inwazję oraz migrację. Zrozumienie biologicznych zawiłości EMT może dostarczyć cennych informacji mających wpływ na zastosowane leczenie zmniejszające ryzyko przerzutów [16,17,23]. Zasadniczym wyzwaniem w badaniu EMT jest fakt, że reprezentuje ona stan przejściowy. Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że w niektórych sytuacjach, po migracji komórki rakowej, która przeszła EMT do odległego miejsca, możliwy jest proces odwrotny czyli przemiana mezenchymalno–nabłonkowa [24]. Różne publikacje

opisują zmianę fenotypu nabłonkowego i mezenchymalnego w procesach EMT i MET w modelach jelita grubego, pęcherza moczowego, jajnika i raka piersi [20,25]. Chociaż EMT jest znana jako naturalny proces pełniący ważną rolę w rozwoju oraz np. w gojeniu się ran, komórki rakowe mogą ją wykorzystać jako proces umożliwiający tworzenie przerzutów [7,9]. Niedawno stało się jasne, że proces EMT jest ściśle związany z chemioopornością raka [18].

II.7. Markery EMT

Ekspresja białek markerowych EMT jest w dużej mierze regulowana przez czynniki transkrypcyjne, zwłaszcza Snail i Slug. Aktywacja Snail i Slug odgrywa centralną rolę w inicjacji procesu EMT i represji ekspresji markerów nabłonkowych [4,18,23,26]. Ekspresja Snail, Slug, Twist w raku piersi jest związana ze złym rokowaniem.

Slug należy do rodziny czynników transkrypcyjnych typu palca cynkowego [13,22,26,27]. Jest on zaangażowany w regulację migracji komórek podczas embriogenezy oraz w regulację inwazji i migracji komórek nowotworowych odgrywając zasadniczą rolę w rozwoju EMT [24]. Białko Slug zmniejsza transkrypcję E-kadheryny w raku sutka, raku żołądka i raku płaskonabłonkowym przetyku [13]. Wykazano również, że ekspresja ER zmniejsza poziom Slug [13]. Ekspresja Slug wykazuje ścisły związek z obecnością przerzutów lokalnych i odległych. Zmniejszenie poziomu Slug hamuje proliferację komórek. Ekspresja Slug wiąże się ze złym rokowaniem [23]. Odkryto, że Slug nie ma związku z wiekiem, rozmiarem guza, statusem węzłów chłonnych. Jednak ma silny związek z ER, statusem PR i typem molekularnym raka sutka [28].

Białko Snail podobnie jak białko Slug również należy do rodziny czynników transkrypcyjnych typu palca cynkowego [26]. Białko to indukuje proces EMT i jest silnym represorem E-kadheryny. Ekspresja Snail przyczynia się do inwazji nowotworów tj. raka piersi, raka jajnika czy raka jelita grubego [26,27]. W naciekającym raku przewodowym sutka ekspresja Snail koreluje z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych pachowych [26].

Snail i Slug mają znaczenie w rozwoju różnych nowotworów, a ich ekspresja jest często związana z niskim stopniem zróżnicowania histologicznego, nawrotem nowotworu, przerzutami i złym rokowaniem [26]. Chociaż Snail i Slug mogą indukować EMT odgrywają one również rolę w utrzymaniu podobnych do komórek macierzystych właściwości komórek nowotworowych, co jest powiązane z odpornością na radioterapię i chemioterapię w różnych typach raka [27].

Przeprowadzone badania w populacjach pacjentów z rakiem przełyku, rakiem jelita grubego i rakiem płuc potwierdziły, że pacjenci Slug-dodatni mają gorsze wyniki leczenia [29]. Ekspresja Slug może być niekorzystną cechą prognostyczną w kilku rodzajach raków u ludzi oraz w niektórych mięśniakach. Slug bierze udział w progresji raka i zmniejsza ekspresję E-kadheryny, desmoplakiny i keratyny-18, ale dokładny mechanizm tych zmian nie jest znany. Jeśli EMT rzeczywiście bierze udział w oporności komórek guza na określone leki, takie jak substancje anty-EGFR, tamoksyfen i klasyczna chemoterapia antracykliną, identyfikacja ścieżek przejściowych może być istotna dla opracowania odpowiedniej terapii celowanej dla raków i złośliwych guzów mezenchymalnych w tym GIST [17,29].

Wimentyna jest białkiem cytoszkieletu o masie 57 kDa, które należy do III typu filamentów pośrednich [30]. Występuje ono w prawidłowych komórkach mezenchymalnych oraz pełni wiele funkcji. Przede wszystkim zapewnia odporność na stres oraz wpływa na zachowanie integralności komórkowej. Wimentyna odgrywa rolę w rozwoju gruczołu piersiowego, układu nerwowego oraz w procesie angiogenezy. Ponadto hamuje przyleganie komórek i wpływa na ich migrację [31]. Białko to ulega nadekspresji w niektórych nowotworach pochodzenia nabłonkowego, m.in. raku stercza, sutka, płuc, a także czerniaku i nowotworach ośrodkowego układu nerwowego. W raku jasnokomórkowym nerki stwierdza się zaś koekspresję cytokeratyny i wimentyny. Wykazano ścisły związek ekspresji wimentyny z przemianą nabłonkowo-mezenchymalną. Podczas procesu EMT komórka uzyskuje fenotyp mezenchymalny, dzięki czemu zwiększa się jej zdolność do migracji oraz zyskuje ona odporność na apoptozę. Ekspresja wimentyny dodatkowo koreluje ze wzrostem i inwazją nowotworu. Jej obecność w komórkach raka przewodowego piersi świadczy o ich przeprogramowaniu w kierunku mezenchymalnym i jest zwykle związana ze złym rokowaniem [31]. Wyniki niektórych badań wskazują, że podwyższony poziom wimentyny koreluje z wyższym stopniem złośliwości histologicznej nowotworu, podwyższonym indeksem proliferacyjnym (Ki67>15%) oraz niższym poziomem ekspresji receptora estrogenów [32]. Ekspresja wimentyny jest zależna od typu histologicznego nowotworu. Opisano, iż jej poziom jest najwyższy w raku piersi potrójnie negatywnym [30,32]. Jednocześnie wskazuje to, iż ekspresja wimentyny jest powiązana z gorszym rokowaniem nowotworu. Ponadto opisano, iż raki z podwyższonym poziomem wimentyny częściej występują w grupie młodszych kobiet [30]. Wimentyna odgrywa ważną rolę regulatorową w różnych grupach nowotworów i jest cennym markerem w określaniu skuteczności zastosowanego leczenia [30,31]. W kilku pracach stwierdzono, iż guzy z wysokim poziomem ekspresji wimentyny wykazują lepszą odpowiedź na zastosowaną chemioterapię [31].

Kadheryny są rodziną białek przezbłonowych, które uczestniczą w oddziaływaniach między komórkami z udziałem jonów wapnia [33,34]. Domena wewnątrzkomórkowa kadheryny może wiązać się z białkami z grupy katenin, które z kolei wiążą się z filamentami aktynowymi. Kompleksy kadheryna-katenina są kluczowe dla zdolności wzajemnego przylegania komórek. Różne typy komórek wykazują obecność różnych podgrup kadheryn [35]. Głównymi klasycznymi kadherynami typu I są P-łożyskowa, E-nabłonkowa i N-neuronalna.

Nabłonkowa E-kadheryna jest kluczowym składnikiem połączeń typu *adherens* w komórkach nabłonka i działa jako supresor wzrostu guza i inwazji. Nerwowa N-kadheryna ulega ekspresji w tkankach nerwowych i fibroblastach, gdzie pośredniczy w mniej stabilnej i bardziej dynamicznej postaci adhezji komórkowej [35]. Łożyskowa P-kadheryna wykazuje znaczącą ekspresję w łożysku, gdzie bierze udział w adhezji między trofoblastem zarodka a komórkami maczynymi.

Deregulacja ekspresji kadheryn, w szczególności utrata nabłonkowej E-kadheryny i wzrost ekspresji neuronalnej N-kadheryny, jest zaangażowana w progresję raka [35,36]. Wiąże się to ze wzrostem możliwości migracji, inwazji i przerzutów komórek guza [34].

W kilku pracach opisano związek utraty ekspresji E-kadheryny z gorszym rokowaniem i krótszym przeżyciem u pacjentów z rakiem piersi [36,37]. Wynika to głównie ze zdolności do angioinwazji oraz obecności przerzutów do węzłów chłonnych pachowych [37].

II.8. Rola EMT w tworzeniu przerzutów

Inwazja jest jedną z głównych cech charakterystycznych raka. Dowody na rolę procesu EMT w zdolności przerzutowania nowotworu pochodzą z badań eksperymentalnych, w których EMT można indukować w warunkach *in vitro* [38,39,40,41]. Przeprogramowana komórka nabłonkowa zyskuje kształt wrzecionowaty i zwiększa się jej mobilność. Opublikowane wyniki badań sugerują, że EMT ma duże znaczenie dla inwazji tkanek i naczyń [42]. EMT rzadko występuje jednorodnie w całym guzie. Postawiono hipotezę, że komórki nowotworowe raka piersi na granicy guza tracą właściwości nabłonkowe i nabywają cech komórek mezenchymalnych. Wykazano, że białka Snail, Slug, Twist i Zeb1 mają różną ekspresję w normalnym nabłonku piersi, raku przewodowym *in situ* i inwazyjnym raku piersi [7]. Rak *in situ* zawiera mniej białka Slug i Twist a więcej Zeb1 w porównaniu do

normalnego nabłonka. W przeciwieństwie do innych raków piersi w raku zrazikowym ekspresja markerów EMT pojawia się jednakowo w całym guzie [7].

Zdolność raka piersi do tworzenia przerzutów można lepiej zrozumieć poprzez zrozumienie mechanizmów EMT. Pod tym względem EMT może stwarzać możliwości dla nowo ukierunkowanych terapii [43,44]. Badanie szlaków związanych ze zróżnicowaniem ekspresji genów wykazało, że są one głównie związane z adhezją, migracją, rozwojem, różnicowaniem komórek, proliferacją, angiogenezą, gojeniem się ran i metabolizmem [7].

Chociaż wiele prac badawczych zostało już wykonanych, specyficzne ścieżki molekularne EMT odnoszące się do rozwoju guza i jego lokalizacji wymagają dalszych badań. Rak piersi wywodzi się z tkanki nabłonkowej, a zatem pierwotnie charakteryzuje się tworzeniem ścisłych połączeń komórkowych typu *adherens*. Markery mezenchymalne EMT takie jak wimentyna, N-kadheryna, Snail i Slug częściej występują w rakach piersi o niższym stopniu zróżnicowania histologicznego i są związane z wyższą agresywnością nowotworu [38]. Jednym z wyzwań w trakcie prowadzenia badań nad EMT jest to, że trudno jest uchwycić komórkę rakową, która w danym momencie przeszła przemianę. Zazwyczaj podczas oceny histopatologicznej obserwujemy komórki „zatrzymane w wybranym momencie”.

Większość dowodów pochodzących z badań na liniach komórek rakowych i/lub modelach zwierzęcych, wskazuje na związek pomiędzy progresją raka piersi a EMT. Ekspresja biomarkerów związanych z EMT u wielu pacjentów będzie miała kluczowe znaczenie dla identyfikacji osób zagrożonych rozwojem lekooporności i wystąpieniem przerzutów. Wiąże się to z możliwością lepszej diagnostyki i poprawą sposobów leczenia [6,13,23,24,45].

III. CEL PRACY

Ocena ekspresji markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej, tj. E-kadheryny, N-kadheryny, Slug, Snail i wimentyny w komórkach raka sutka oraz ich korelacja z:

- a) wiekiem chorych
- b) średnicą guza
- c) stanem węzłów chłonnych
- d) obecnością przerzutów odległych
- e) typem histologicznym raka
- f) stopniem histologicznej złośliwości raka
- g) obecnością angioinwazji
- h) typem molekularnym raka
- i) ekspresją PR, ER, HER2, Ki67
- j) zastosowaną chemioterapią przedoperacyjną (CTH)

IV. MATERIAŁ I METODY

IV.1. Charakterystyka grupy badanej

Badanie przeprowadzono na materiale tkankowym od 65 pacjentek, u których wykonano całkowitą mastektomię z powodu pierwotnego naciekającego raka sutka. Pacjentki były operowane w latach 2013-2018 w Klinice Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (SPSK1 PUM). Rozpoznanie histopatologiczne w każdym przypadku zostało postawione w Zakładzie Patomorfologii SPSK1 PUM. Grupa badana została scharakteryzowana według następujących parametrów kliniczno-morfologicznych: wiek w chwili rozpoznania, średnica guza, obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachowych, obecność przerzutów odległych, typ histologiczny raka, stopień histologicznej złośliwości, obecność angioinwazji, typ molekularny raka, ekspresja receptorów ER, PR, HER2, indeks proliferacyjny (Ki67) oraz zastosowanie chemioterapii przedoperacyjnej (CTH). Z materiału tkankowego utrwalonego standardowo w zbuforowanej formalinie oraz zatopionego w bloczkach parafinowych zostały sporządzone macierze tkankowe przy pomocy urządzenia MTA – *Manual Tissue Arrayer* (Beecher Instruments, Inc. Silver Spring, MD, USA). Procedura przygotowania macierzy tkankowych polegała na pobraniu trzech rdzeni tkankowych z każdego z bloczków parafinowych zawierających materiał histologiczny z raka sutka i umieszczeniu ich w trzech zbiorczych bloczkach parafinowych. Materiał do konstrukcji macierzy tkankowych pobierano z inwazyjnego obwodu guza. Na badanie uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej PUM w Szczecinie (KB-0012/224/06/17 z dnia 26.06.2017r.). Charakterystykę grupy badanej zawarto w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka grupy badanej (n=65).

| Parametr | Liczba chorych (N = 65) |
|---|--------------------------------|
| Wiek | |
| ≤65 | 34 (52,3%) |
| >65 | 31 (47,7%) |
| Średnica guza | |
| <1cm | 10 (15,4%) |
| 1-2 cm | 26 (40,0%) |
| >2 cm | 29 (44,6%) |
| Stan węzłów chłonnych | |
| bez przerzutów | 38 (58,5%) |
| przerzuty w 1-3 węzłach | 18 (27,7%) |
| przerzuty w 4-9 węzłach | 7 (10,8%) |
| przerzuty ≥10 węzłów | 2 (3,0%) |
| Obecność przerzutów odległych | |
| bez przerzutów | 65 (100%) |
| z przerzutami | 0 (0%) |
| Typ histologiczny raka | |
| rak przewodowy | 45 (69,2%) |
| rak zrazikowy | 14 (21,5%) |
| inne* | 4 (6,2%) |
| rak przewodowy + rak zrazikowy | 2 (3,1%) |
| Stopień złośliwości histologicznej | |
| G1 | 10 (15,4%) |
| G2 | 45 (69,2%) |
| G3 | 10 (15,4%) |
| Angioinwazja | |
| brak | 46 (70,8%) |
| obecna | 19 (29,2%) |
| Typ molekularny raka | |
| A | 27 (41,5%) |
| B HER2 (-) | 25 (38,5%) |

| | |
|---------------------------------|------------|
| B HER2 (+) | 6 (9,2%) |
| potrójnie ujemny i nieluminalny | 7 (10,8%) |
| Pozostałe parametry | |
| ER (-) | 11 (16,9%) |
| ER (+) | 54 (83,1%) |
| PR (-) | 12 (18,5%) |
| PR (+) | 53 (81,5%) |
| HER2 (-) | 55 (84,6%) |
| HER2 (+) | 10 (15,4%) |
| Ki67 \leq 20 % | 30 (46,2%) |
| Ki67 $>$ 20 % | 35 (53,8%) |
| CTH nie | 58 (89,2%) |
| CTH tak | 7 (10,8%) |

*/rak brodawkowy (n=2), rak rdzeniasty (n=1), rak sitowaty (n=1)

W badanej grupie pacjentek rozpiętość wieku wahała się między 35 a 88 lat. Wartość średnia wynosiła 64,6 lat a mediana 65 lat. Wyodrębniono dwie grupy pacjentek względem mediany wieku: w wieku równym lub młodsze niż 65 lat (34 pacjentki) i starszym niż 65 lat (31 pacjentek).

Podział grup względem wielkości guza i stanu węzłów chłonnych był oparty na ósmej edycji klasyfikacji patologicznej TNM.

Ze względu na średnicę guza wyodrębniono trzy grupy tzn. średnica guza < 1 cm (10 pacjentek), 1-2 cm (26 pacjentek), >2 cm (29 pacjentek). Wartość średnia rozmiarów guza wynosiła 2,2 cm, zaś mediana 1,8 cm.

Ze względu na liczbę zajętych węzłów chłonnych wyodrębniono cztery grupy tj.: bez przerzutów w węzłach chłonnych (38 pacjentek), 1-3 węzły z przerzutami (18 pacjentek), 4-9 węzłów z przerzutami (7 pacjentek) i \geq 10 węzłów z przerzutami (2 pacjentki).

Biorąc pod uwagę typ histologiczny raków wyodrębniono 4 grupy: rak przewodowy (45 przypadków), rak zrazikowy (14 przypadków), rak mieszany: rak zrazikowy wraz z rakiem przewodowym (2 przypadki) oraz inne raki: rak brodawkowy (2 przypadki), rak rdzeniasty (1 przypadek), rak sitowaty (1 przypadek).

Grupę badaną podzielono również w oparciu o stopień złośliwości histologicznej wg klasyfikacji *SBR/Nottingham*. Wyodrębniono trzy stopnie złośliwości histologicznej: G1 (10 przypadków), G2 (45 przypadków), G3 (10 przypadków).

W zależności od ekspresji receptorów steroidowych (ER lub PR) i białka HER2 analizowane raki piersi zostały podzielone na typy molekularne: typ luminalny A (27 przypadków), typ luminalny B HER2-ujemny (25 przypadków), luminalny B HER2-dodatni (6 przypadków) i pozostałe: potrójnie ujemny i Nieluminalny (7 przypadków).

IV.2. Reakcje immunohistochemiczne

W preparatach z macierzy tkankowych wykonane zostały reakcje immunohistochemiczne z przeciwciałami przeciwko:

- E-kadherynie (IR059; DAKO, Glostrup, Denmark),
- N-kadherynie (orb213706 Biorbyt, Cambridge UK),
- wimentynie (IR630; DAKO, Glostrup, Denmark),
- Snail (orb221325, Biorbyt, Cambridge, UK)
- Slug (orb11382, Biorbyt, Cambridge, UK).

Do wizualizacji reakcji IHC zastosowany został system DAKO FLEX+. Reakcje immunohistochemiczne wykonywane były w oddzielnych preparatach dla każdego z badanych białek.

a) Procedura reakcji immunohistochemicznych dla oceny ekspresji E-kadheryny, N-kadheryny i wimentyny:

1. odparafinowanie preparatów w temperaturze 69°C przez 40 minut,
2. odsłanianie antygeny w temperaturze 98°C przez 20 minut przy pH 9,0, (DM828; DAKO, Glostrup, Denmark),
3. płukanie w Wash Buffer (DM831; DAKO, Glostrup, Denmark) przez 10 minut,
4. blokowanie endogennej peroksydazy (SM801; DAKO, Glostrup, Denmark) przez 5 minut i ponowne płukanie w Wash Buffer,
5. inkubowanie preparatów w komorze wilgotnej z przeciwciałem przeciwko E-kadherynie (rozcieńczenie 1:100, IR059; DAKO, Glostrup, Denmark), przeciwko N-kadherynie (rozcieńczenie 1:100; orb213706 Biorbyt, Cambridge UK),

- przeciwko wimentynie (rozcieńczenie 1:100, IR630; DAKO, Glostrup, Denmark) przez 20 minut, w temperaturze 4°C
6. trzykrotne płukanie preparatów w Wash Buffer przez 5 minut oraz inkubowanie ich z polimerem HRP (SM802; DAKO, Glostrup, Denmark) w temperaturze pokojowej przez 20 minut.
 7. ponowne trzykrotne płukanie preparatów w Wash Buffer przez 5 minut oraz inkubowanie z chromogenem tj. mieszaniną 1 ml Substrate Buffer z 1 kroplą DAB przez 10 minut,
 8. płukanie preparatów w wodzie destylowanej oraz barwienie hematoksyliną Mayera (SM806; DAKO, Glostrup, Denmark) przez 10 minut,
 9. płukanie preparatów w wodzie bieżącej przez 10 minut oraz odwadnianie ich w rosnącym stężeniu etanolu 70%, 90%, 100%,
 10. dwukrotne zanurzenie preparatów w ksylenie oraz przykrycie wybarwionych skrawków szkiełkiem nakrywkowym z użyciem balsamu histologicznego Consul-Mount (Shandon, 999040, Pittsburg, PA, USA).

b) Procedura reakcji immunohistochemicznych dla oceny ekspresji Snail i Slug:

1. odparafinowanie preparatów w cieplarni w temperaturze 69°C przez 40 minut,
2. odsłanianie antygenu w temperaturze 98°C przez 20 minut przy pH 6,0 (DM829; DAKO, Glostrup, Denmark),
3. płukanie preparatów w Wash Buffer (DM831; DAKO, Glostrup, Denmark) przez 10 minut,
4. blokowanie przez 5 min endogennej peroksydazy (SM801; DAKO, Glostrup, Denmark),
5. ponowne płukanie preparatów w Wash Buffer trzy razy przez 5 minut,
6. inkubowanie preparatów w komorze wilgotnej z przeciwciałem przeciwko białku Snail (rozcieńczenie 1:50; orb221325, Biorbyt, Cambridge, UK) oraz z przeciwciałem przeciwko białku Slug (rozcieńczenie 1:50; orb11382, Biorbyt, Cambridge, UK) przez noc w temperaturze 4°C,
7. ponowne trzykrotne płukanie preparatów w Wash Buffer przez 5 minut,
8. inkubowanie preparatów z polimerem HRP (SM802; DAKO, Glostrup, Denmark) w temperaturze 37°C przez 60 minut,
9. trzykrotne płukanie preparatów w Wash Bufer przez 10 minut,

10. inkubowanie preparatów przez 10 minut z chromogenem tj. mieszaniną 1 ml Substrate Buffer z 1 kroplą DAB,
11. płukanie preparatów w wodzie destylowanej oraz barwienie hematoksyliną Mayera (SM806; DAKO, Glostrup, Denmark) przez 10 minut,
12. płukanie preparatów w wodzie bieżącej przez 10 minut oraz odwadnianie w rosnącym stężeniu etanolu 70%, 90%, 100%,
13. dwukrotne zanurzanie preparatów w ksylenie oraz przykrycie wybarwionych skrawków szkiełkiem nakrywkowym z użyciem balsamu histologicznego Consul-Mount (Shandon, 999040, Pittsburg, PA, USA).

IV.3. Analiza obrazu mikroskopowego

Ekspresja E-kadheryny (odczyn błonowy), N-kadheryny (odczyn błonowy), wimentyny (odczyn cytoplazmatyczny), białka Snail (odczyn jądrowy i cytoplazmatyczny) i białka Slug (odczyn jądrowy) została oceniona w komórkach rakowych za pomocą komputerowej analizy obrazu (Aperio System; Aperio Technologies Inc. Vista, CA, USA). Określona została intensywność ekspresji w/w białek w skali 4-stopniowej (0 – brak reakcji immunohistochemicznej, 1 – słaba reakcja, 2 – reakcja o średniej intensywności; 3 – silna reakcja) oraz w skali 5-stopniowej oceniono odsetek komórek wykazujących dodatnią reakcję immunohistochemiczną (0: $\leq 5\%$; 1: pomiędzy $> 5\%$ i $\leq 25\%$; 2: pomiędzy $>25\%$ i $\leq 50\%$; 3: pomiędzy $>50\%$ i $\leq 75\%$; 4: $>75\%$). W oparciu o powyższe parametry obliczano współczynnik QS (*quick score*), który jest iloczynem intensywności reakcji (od 0 do 3) i odsetka komórek (od 0 do 4). Współczynnik QS może osiągać wartości od 0 do 12.

IV.4. Analiza statystyczna

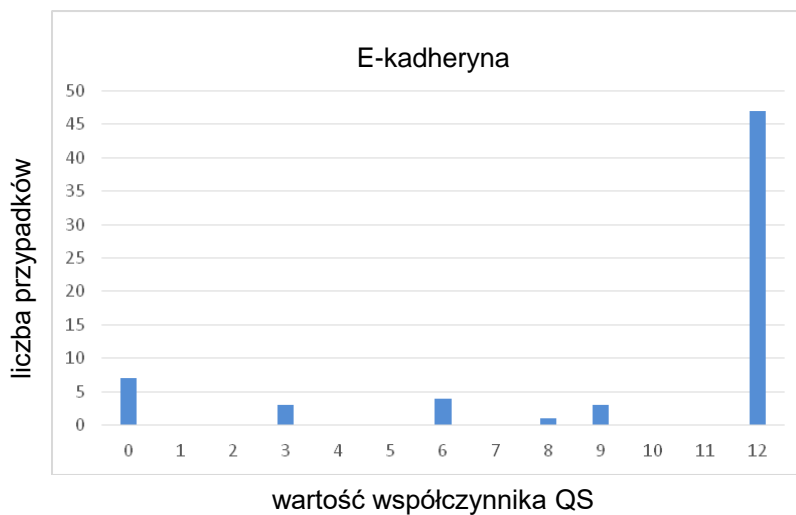
Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu statystycznego MedCalc (ver. 19.2.6, Ostend, Belgia). Normalność rozkładów zmiennych ciągłych weryfikowano testem Shapiro-Wilka. Do opisu zmiennych ciągłych zastosowano średnią, odchylenie standardowe i medianę, zaś w analizach statystycznych skorzystano z testów nieparametrycznych (testy U Manna-Whitneya lub Kruskalla-Wallisa). Zmienne jakościowe charakteryzowano podając liczebność wyrażoną także w procentach. Za poziom istotności przyjęto dwustronnie $p < 0,05$. W tabelach podano średnie oraz odchylenia standardowe (SD –

standard deviation), na wykresach podano średnie, odchylenia standardowe i błąd standardowy (SE – *standard error*). Dokonano analizy statystycznej ekspresji E-kadheryny, N-kadheryny, wimentyny, Slug i Snail w zależności od badanych parametrów morfologiczno-klinicznych i klasyfikacji molekularnej raków piersi.

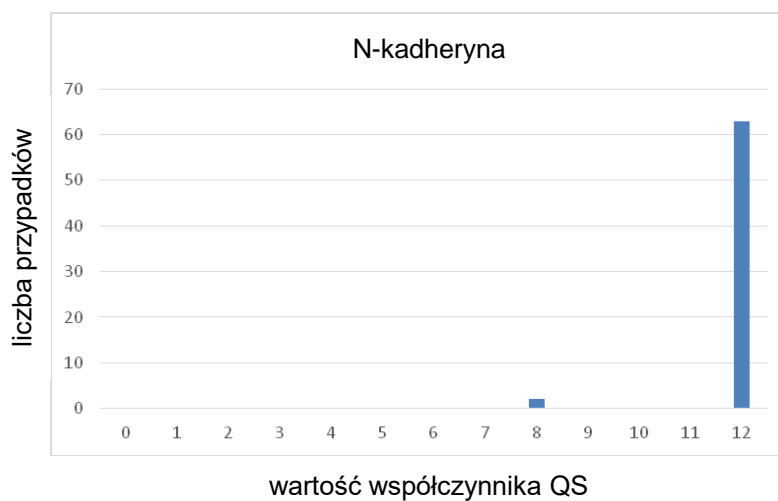
V. WYNIKI

Poniżej przedstawiłam dystrybucję QS (*quick score*) dla poszczególnych markerów EMT. Uwagę zwraca większa heterogenność dystrybucji ekspresji większości markerów mezenchymalnych (Slug, Snail, wimentyna) w stosunku do markera nabłonkowego (E-kadheryna).

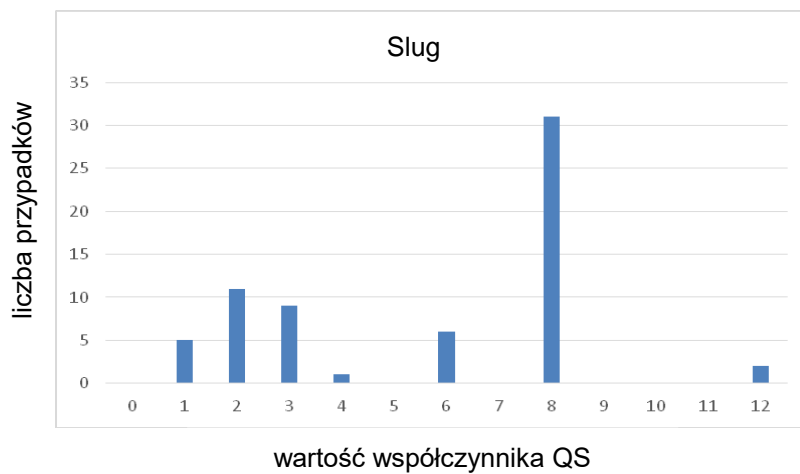
Rycina 1. Dystrybucja QS dla E-kadheryny.



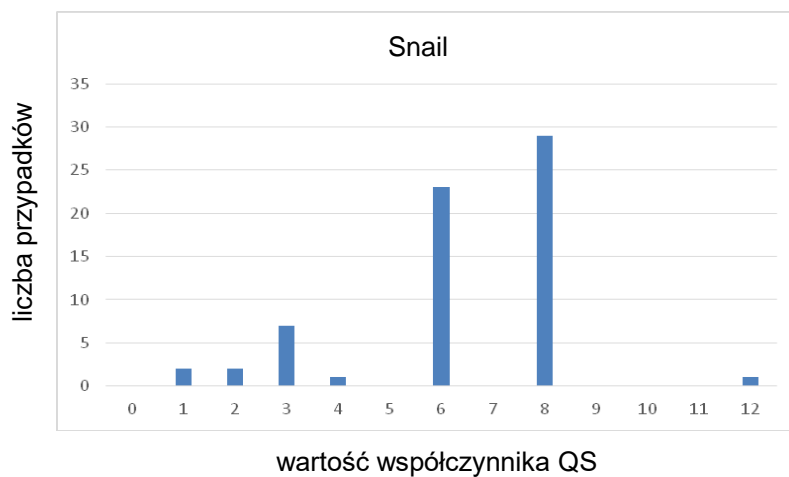
Rycina 2. Dystrybucja QS dla N-kadheryny.



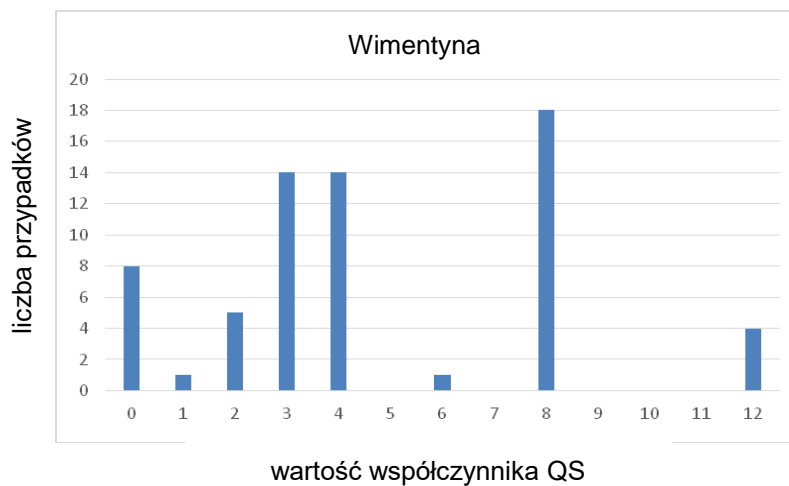
Rycina 3. Dystrybucja QS dla Slug.



Rycina 4. Dystrybucja QS dla Snail.



Rycina 5. Dystrybucja QS dla wimentyny.



V.1. Ekspresja markerów EMT a wiek pacjentek

Poszukiwałam różnic ekspresji markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej wyrażonej za pomocą parametru QS w zależności od wieku pacjentek podzielonych na dwie grupy względem mediany wieku. Wyniki przedstawiłam w tabeli 2.

Tabela 2. Wartość QS markerów EMT (E-kadheryny, N-kadheryny, Slug, Snail i wimentyny) w zależności od wieku pacjentek.

| | n = 34 | n = 31 | |
|--------------------|---------------------|---------------------|----------|
| | wiek ≤65 | wiek >65 | |
| | średnia ± SD | średnia ± SD | p |
| E-kadheryna | 9,85 ± 4,02 | 9,58 ± 4,34 | 0,80 |
| N-kadheryna | 11,88 ± 0,69 | 11,87 ± 0,72 | 0,95 |
| Slug | 5,94 ± 3,14 | 5,29 ± 2,83 | 0,37 |
| Snail | 6,56 ± 2,11 | 6,13 ± 2,19 | 0,59 |
| Wimentyna | 5,09 ± 3,20 | 4,32 ± 3,35 | 0,21 |

Nie stwierdziłam różnic ekspresji badanych markerów w zależności od wieku badanych kobiet ($p > 0,05$).

V.2. Ekspresja markerów EMT a średnica guza

Oceeniłam ekspresję markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej wyrażoną za pomocą parametru QS w zależności od średnicy guza. Wyniki przedstawiłam w tabeli 3.

Tabela 3. Wartość QS markerów EMT (E-kadheryny, N-kadheryny, Slug, Snail i wimentyny) a średnica guza.

| E-kadheryna | N | średnia ± SD | p |
|--------------------|----------|---------------------|----------|
| <1 cm | 10 | 11,4 ± 1,90 | 0,35 |
| 1-2 cm | 26 | 10,0 ± 3,61 | |
| >2 cm | 29 | 8,9 ± 4,97 | |
| N-kadheryna | | | |
| <1 cm | 10 | 12,0 ± 0,0 | 0,22 |
| 1-2 cm | 26 | 11,69 ± 1,09 | |
| >2 cm | 29 | 12,0 ± 0,0 | |
| Slug | | | |
| < 1cm | 10 | 7,3 ± 2,83 | 0,12 |
| 1-2 cm | 26 | 5,0 ± 2,98 | |
| > 2cm | 29 | 5,62 ± 2,93 | |
| Snail | | | |
| < 1 cm | 10 | 6,8 ± 1,4 | 0,82 |
| 1-2 cm | 26 | 6,42 ± 2,34 | |
| > 2 cm | 29 | 6,14 ± 2,20 | |
| Wimentyna | | | |
| < 1cm | 10 | 4,9 ± 3,03 | 0,28 |
| 1-2 cm | 26 | 3,81 ± 3,20 | |
| > 2 cm | 29 | 5,48 ± 3,31 | |

Nie stwierdziłam różnic ekspresji badanych markerów w zależności od średnicy guza ($p > 0,05$).

V.3. Ekspresja markerów EMT a stan węzłów chłonnych

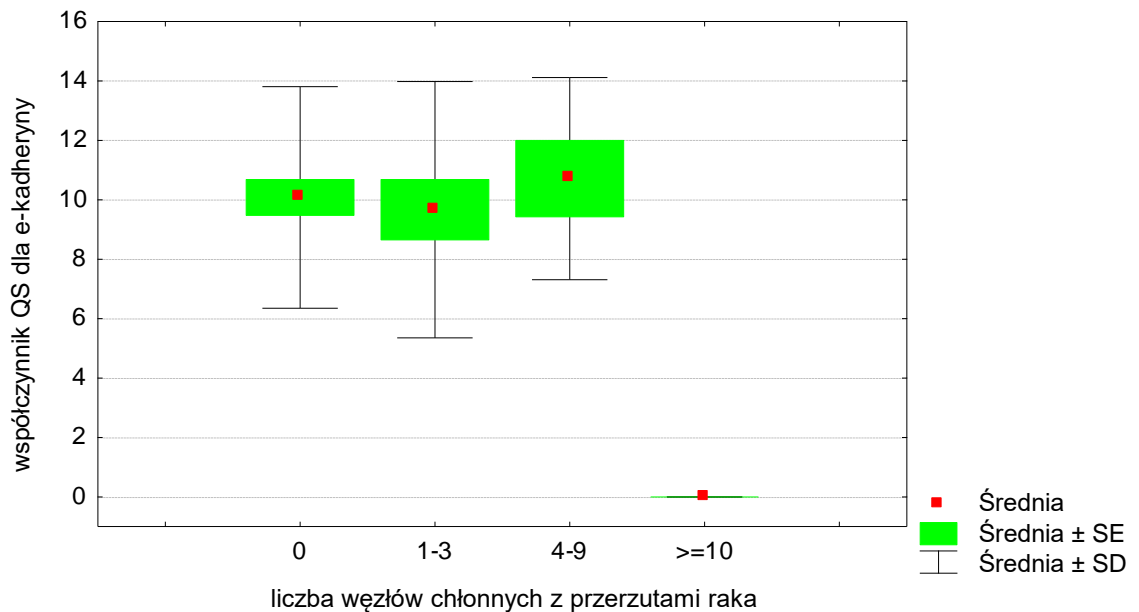
Oceeniłam ekspresję markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej wyrażoną za pomocą parametru QS w zależności od stanu węzłów chłonnych. Wyniki przedstawiłam w tabeli 4.

Tabela 4. Wartość QS markerów EMT (E-kadheryny, N-kadheryny, Slug, Snail i wimentyny) a stan węzłów chłonnych.

| E-kadheryna | N | średnia ± SD | p |
|--------------------|----------|---------------------|-------------|
| 0 | 38 | 10,08 ± 3,73 | 0,04 |
| 1-3 węzły | 18 | 9,67 ± 4,31 | |
| 4-9 węzłów | 7 | 10,71 ± 3,40 | |
| ≥10 węzłów | 2 | 0,0 ± 0,0 | |
| N-kadheryna | | | |
| 0 | 38 | 11,79 ± 0,91 | 0,70 |
| 1-3 węzły | 18 | 12,0 ± 0,0 | |
| 4-9 węzłów | 7 | 12,0 ± 0,0 | |
| ≥10 węzłów | 2 | 12,0 ± 0,0 | |
| Slug | | | |
| 0 | 38 | 5,53 ± 3,08 | 0,85 |
| 1-3 węzły | 18 | 5,61 ± 2,70 | |
| 4-9 węzłów | 7 | 5,71 ± 2,87 | |
| ≥10 węzłów | 2 | 7,5 ± 6,36 | |
| Snail | | | |
| 0 | 38 | 6,29 ± 1,97 | 0,96 |
| 1-3 węzły | 18 | 6,5 ± 1,89 | |
| 4-9 węzłów | 7 | 6,14 ± 3,76 | |
| ≥10 węzłów | 2 | 7,0 ± 1,41 | |
| Wimentyna | | | |
| 0 | 38 | 4,87 ± 3,53 | 0,20 |
| 1-3 węzły | 18 | 3,94 ± 2,51 | |
| 4-9 węzłów | 7 | 6,57 ± 3,41 | |
| ≥10 węzłów | 2 | 2,5 ± 0,71 | |

Stwierdziłam brak ekspresji E-kadheryny w komórkach rakowych w guzie pierwotnym w przypadku zajęcia przerzutami więcej niż 10 węzłów chłonnych ($p=0,04$). Wartość współczynnika QS dla ekspresji E-kadheryny w zależności od stanu węzłów chłonnych przedstawiłam w postaci graficznej na rycinie 6.

Rycina 6. Ekspresja E-kadheryny a liczba węzłów chłonnych z przerzutami.



V.4. Ekspresja markerów EMT a obecność przerzutów odległych

W analizowanych przypadkach nie stwierdziłam obecności przerzutów odległych. Z tego względu wynik nie został poddany analizie statystycznej.

V.5. Ekspresja markerów EMT a typ histologiczny raka

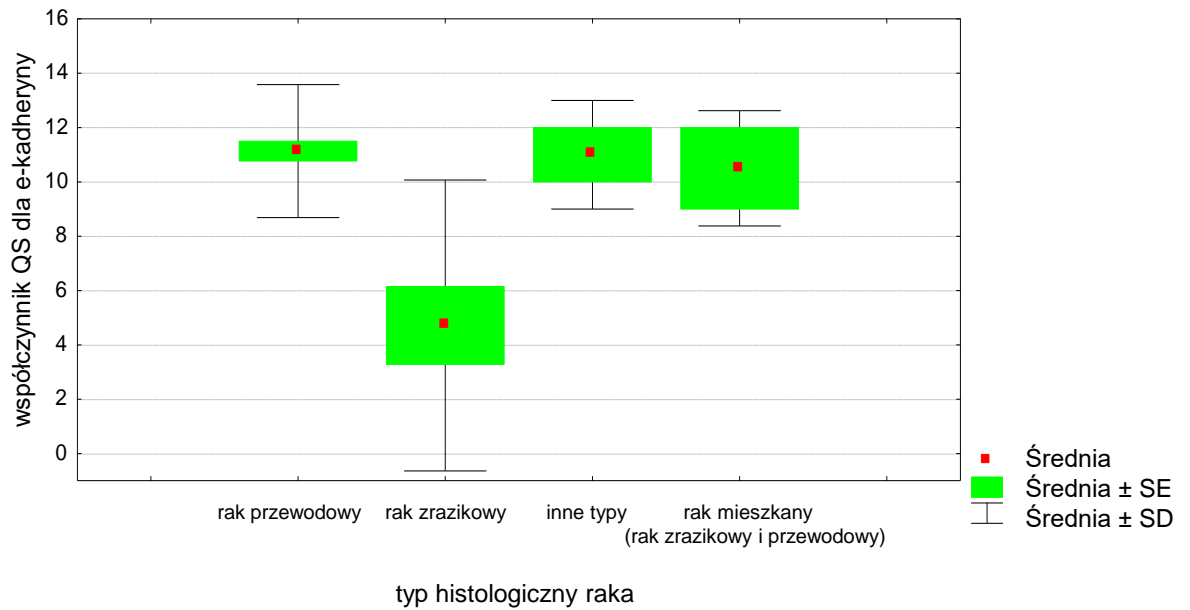
Oceeniłam ekspresję markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej wyrażoną za pomocą parametru QS w zależności od typu histologicznego raka piersi. Wyniki przedstawiłam w tabeli 5.

Tabela 5. Wartość QS markerów EMT (E-kadheryny, N-kadheryny, Slug, Snail i wimentyny) a typ histologiczny raka piersi.

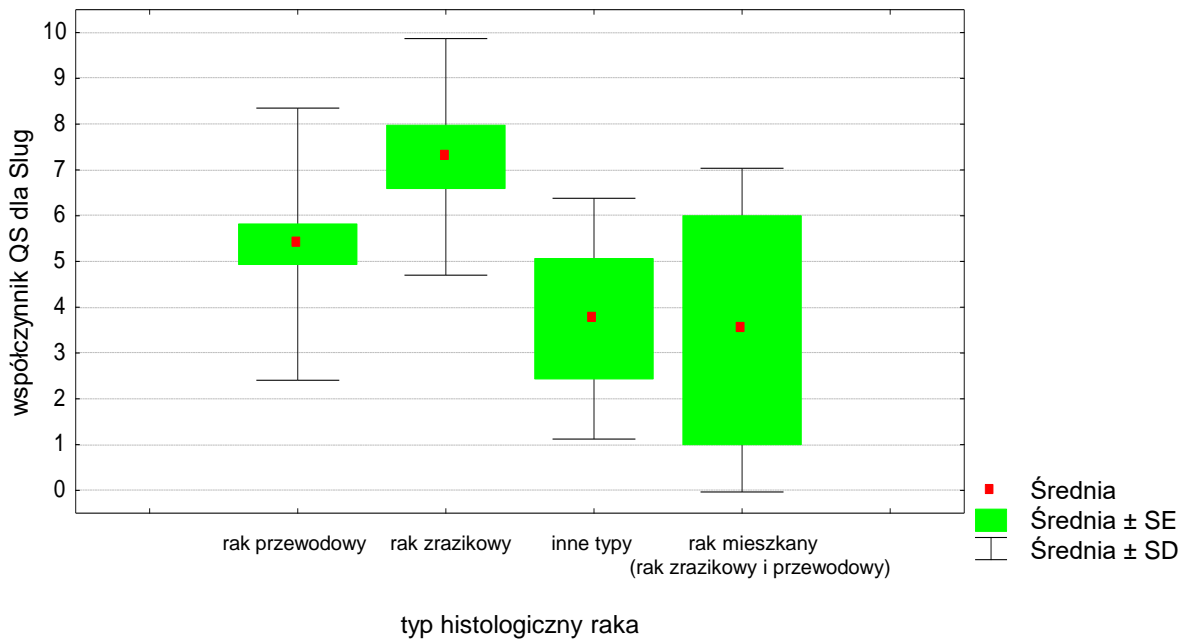
| E-kadheryna | N | średnia ± SD | p |
|--------------------|----------|---------------------|---------------|
| Rak przewodowy | 45 | 11,13 ± 2,45 | 0,0001 |
| Rak zrazikowy | 14 | 4,71 ± 5,36 | |
| N-kadheryna | | | |
| Rak przewodowy | 45 | 11,91 ± 0,59 | 0,79 |
| Rak zrazikowy | 14 | 11,71 ± 1,07 | |
| Slug | | | |
| Rak przewodowy | 45 | 5,38 ± 2,97 | 0,03 |
| Rak zrazikowy | 14 | 7,29 ± 2,58 | |
| Snail | | | |
| Rak przewodowy | 45 | 6,11 ± 2,21 | 0,13 |
| Rak zrazikowy | 14 | 6,79 ± 1,93 | |
| Wimentyna | | | |
| Rak przewodowy | 45 | 5,11 ± 3,21 | 0,33 |
| Rak zrazikowy | 14 | 3,5 ± 3,20 | |

Stwierdziłam, że ekspresja E-kadheryny jest istotnie niższa w raku zrazikowym w porównaniu do raka przewodowego ($p=0,0001$). W przypadku białka Slug jego ekspresja była istotnie wyższa w raku zrazikowym w porównaniu do raka przewodowego ($p=0,03$). Wartość współczynnika QS dla ekspresji E-kadheryny w zależności od typu histologicznego raka przedstawiłam w postaci graficznej na rycinie 7 a wartość współczynnika QS dla ekspresji Slug przedstawiłam w postaci graficznej na rycinie 8.

Rycina 7. Ekspresja E-kadheryny a typ histologiczny raka piersi.



Rycina 8. Ekspresja Slug a typ histologiczny raka piersi.



V.6. Ekspresja markerów EMT a stopień histologicznej złośliwości raka piersi

Oceeniłam ekspresję markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej wyrażoną za pomocą parametru QS w zależności od stopnia histologicznej złośliwości raka (*grade*) ocenionej wg klasyfikacji *SBR/Nottingham*. Wyniki przedstawiłam w tabeli 6.

Tabela 6. Wartość QS markerów EMT (E-kadheryny, N-kadheryny, Slug, Snail i wimentyny) a stopień złośliwości histologicznej (*grade*) raka sutka.

| E-kadheryna | N | średnia ± SD | p |
|--------------------|----------|---------------------|----------|
| G1 | 10 | 9,6 ± 5,06 | 0,95 |
| G2 | 45 | 9,71 ± 4,11 | |
| G3 | 10 | 9,9 ± 3,75 | |
| N-kadheryna | | | |
| G1 | 10 | 12,0 ± 0,0 | 0,64 |
| G2 | 45 | 11,82 ± 0,83 | |
| G3 | 10 | 12,0 ± 0,0 | |
| Slug | | | |
| G1 | 10 | 5,3 ± 2,87 | 0,75 |
| G2 | 45 | 5,53 ± 3,15 | |
| G3 | 10 | 6,4 ± 2,46 | |
| Snail | | | |
| G1 | 10 | 6,7 ± 1,89 | 0,75 |
| G2 | 45 | 6,27 ± 1,99 | |
| G3 | 10 | 6,4 ± 3,06 | |
| Wimentyna | | | |
| G1 | 10 | 3,6 ± 2,17 | 0,27 |
| G2 | 45 | 4,76 ± 3,58 | |
| G3 | 10 | 5,7 ± 2,50 | |

Nie stwierdziłam różnic w ekspresji badanych markerów w zależności od stopnia histologicznej złośliwości raka ($p > 0,05$).

V.7. Ekspresja markerów EMT a angioinwazja

Oceńłam ekspresję markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej wyrażoną za pomocą parametru QS w zależności od obecności angioinwazji. Wyniki przedstawiłam w tabeli 7.

Tabela 7. Wartość QS markerów EMT (E-kadheryny, N-kadheryny, Slug, Snail i wimentyny) a obecność angioinwazji.

| | angio (+) n=19 | angio (-) n=46 | |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|----------|
| | średnia ± SD | średnia ± SD | p |
| E-kadheryna | 10,74 ± 3,36 | 9,30 ± 4,40 | 0,17 |
| N-kadheryna | 11,79 ± 0,92 | 11,91 ± 0,59 | 0,52 |
| Slug | 5,42 ± 2,57 | 5,72 ± 3,17 | 0,80 |
| Snail | 6,68 ± 2,63 | 6,22 ± 1,92 | 0,30 |
| Wimentyna | 4,37 ± 2,77 | 4,87 ± 3,47 | 0,66 |

Parametr QS badanych markerów nie różnił się istotnie w kategoriach obecności angioinwazji ($p > 0,05$).

V.8. Ekspresja markerów EMT a typ molekularny raka piersi

Oceńłam ekspresję markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej wyrażoną za pomocą parametru QS w zależności od typu molekularnego raka piersi. Wyniki przedstawiłam w tabeli 8.

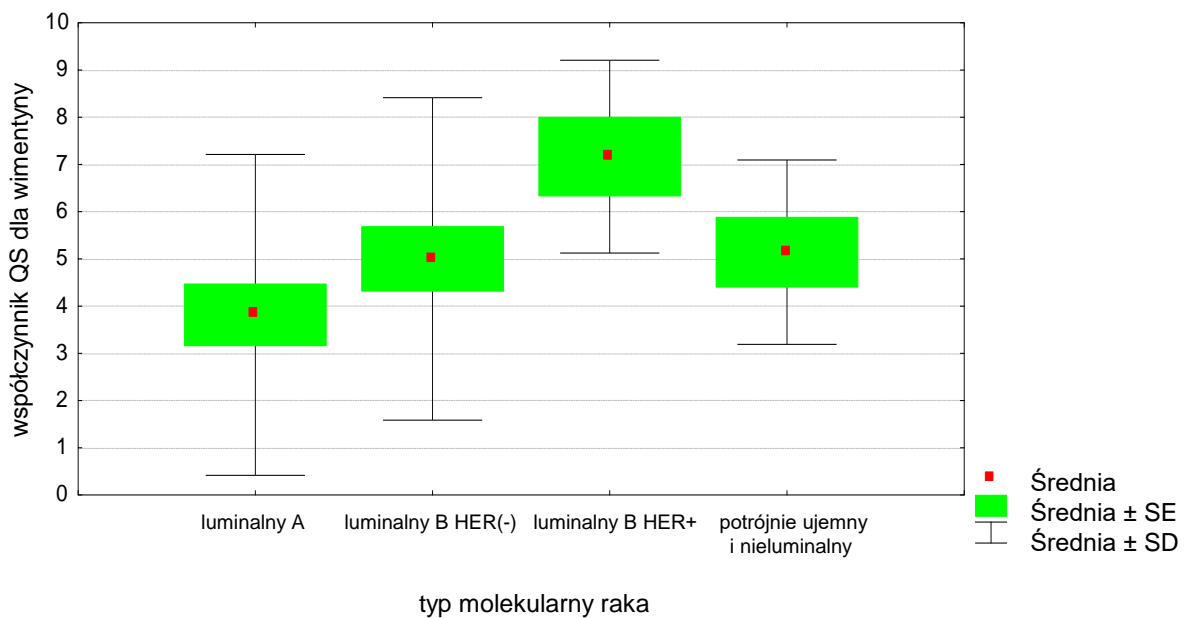
Tabela 8. Wartość QS markerów EMT (E-kadheryny, N-kadheryny, Slug, Snail i wimentyny) a typ molekularny raka piersi.

| E-kadheryna | N | Średnie±SD | p |
|---------------------------------|----------|-------------------|-------------|
| A | 27 | 8,52 ± 5,04 | 0,39 |
| B HER2 minus | 25 | 10,68 ± 3,13 | |
| B HER2 plus | 6 | 10,5 ± 3,67 | |
| Potrójnie ujemny i nieluminalny | 7 | 10,29 ± 3,40 | |
| N-kadheryna | | | |
| A | 27 | 11,85 ± 0,77 | 0,92 |
| B HER2 minus | 25 | 11,84 ± 0,80 | |
| B HER2 plus | 6 | 12,0 ± 0,00 | |
| Potrójnie ujemny i nieluminalny | 7 | 12,0 ± 0,00 | |
| Slug | | | |
| A | 27 | 5,89 ± 2,99 | 0,14 |
| B HER2 minus | 25 | 4,88 ± 3,27 | |
| B HER2 plus | 6 | 5,17 ± 2,56 | |
| Potrójnie ujemny i nieluminalny | 7 | 7,71 ± 0,76 | |
| Snail | | | |
| A | 27 | 6,48 ± 2,23 | 0,09 |
| B HER2 minus | 25 | 6,0 ± 1,96 | |
| B HER2 plus | 6 | 5,33 ± 1,97 | |
| Potrójnie ujemny i nieluminalny | 7 | 8,0 ± 2,00 | |
| Wimentyna | | | |
| A | 27 | 3,81 ± 3,40 | 0,04 |
| B HER2 minus | 25 | 5,0 ± 3,42 | |
| B HER2 plus | 6 | 7,17 ± 2,04 | |
| Potrójnie ujemny i nieluminalny | 7 | 5,14 ± 1,95 | |

Analiza ekspresji wimentyny w zależności od typu molekularnego raka wykazała różnice istotne statystycznie ($p=0,04$). Dalsza analiza (test U Manna-Whitneya) wykazała istotnie statystycznie niższą ekspresję wimentyny w rakach luminalnych A (QS: 3,81 ± 3,40) w stosunku do pozostałych typów molekularnych raków w badanej grupie (QS: 5,37 ± 3,06;

wartość sumaryczna nieprzedstawiona w tabeli 8.), ($p=0,02$). Jednocześnie wykazałam istotnie statystycznie wyższą ekspresję wimentyny w rakach luminalnych B HER2 plus (QS: $7,17 \pm 2,04$) w stosunku do pozostałych typów molekularnych raków ($4,47 \pm 3,28$; wartość sumaryczna nieprzedstawiona w tabeli 8.) ($p=0,04$). Wartość współczynnika QS dla ekspresji wimentyny w zależności od typu molekularnego raka przedstawiłam w postaci graficznej na rycinie 9.

Rycina 9. Ekspresja wimentyny a typ molekularny raka piersi.



V.9. Ekspresja E-kadheryny a ER, PR, HER2, Ki67, CTH

Oceńłam ekspresję E-kadheryny wyrażoną za pomocą parametru QS w zależności od obecności ER, PR, nadekspresji HER2, indeksu proliferacyjnego i zastosowania chemioterapii przedoperacyjnej. Wyniki przedstawiłam w tabeli 9.

Tabela 9. Wartość QS dla E-kadheryny a ER, PR, HER2, Ki67 oraz CTH

| E-kadheryna | N | średnia ± SD | p |
|-------------|----|--------------|------|
| ER (-) | 11 | 10,55 ± 2,88 | 0,76 |
| ER (+) | 54 | 9,56 ± 4,36 | |
| PR (-) | 12 | 10,00 ± 4,11 | 0,80 |
| PR (+) | 53 | 9,66 ± 4,19 | |
| HER2 (-) | 55 | 9,47 ± 4,32 | 0,19 |
| HER2 (+) | 10 | 11,10 ± 2,85 | |
| Ki67 ≤ 20% | 30 | 8,77 ± 4,85 | 0,09 |
| Ki67 > 20% | 35 | 10,54 ± 3,28 | |
| CTH nie | 58 | 9,86 ± 4,06 | 0,38 |
| CTH tak | 7 | 8,57 ± 5,03 | |

Parametr QS dla E-kadheryny nie różnił się istotnie w zależności od kategorii ER, PR, HER2, Ki67, CTH ($p > 0,05$).

V.10. Ekspresja N-kadheryny a ER, PR, HER2, Ki67, CTH

Oceńłam ekspresję N-kadheryny wyrażoną za pomocą parametru QS w zależności od obecności ER, PR, nadekspresji HER2, indeksu proliferacyjnego i zastosowania chemioterapii przedoperacyjnej. Wyniki przedstawiłam w tabeli 10.

Tabela 10. Wartość QS dla N-kadheryny a ER, PR, HER2, Ki67 oraz CTH.

| N-kadheryna | N | Średnie±SD | p |
|-------------|----|--------------|------|
| ER (-) | 11 | 12,00 ± 0,00 | 0,52 |
| ER (+) | 54 | 11,85 ± 0,76 | |
| PR (-) | 12 | 12,00 ± 0,00 | 0,50 |
| PR (+) | 53 | 11,85 ± 0,77 | |
| HER2 (-) | 55 | 11,85 ± 0,76 | 0,54 |
| HER2 (+) | 10 | 12,00 ± 0,00 | |
| Ki67≤20% | 30 | 11,87 ± 0,73 | 0,91 |
| Ki67>20% | 35 | 11,89 ± 0,68 | |
| CTH nie | 58 | 11,86 ± 0,74 | 0,62 |
| CTH tak | 7 | 12,00 ± 0,00 | |

Parametr QS dla N-kadheryny nie różnił się istotnie w zależności od kategorii ER, PR, HER2, Ki67, CTH ($p>0,05$).

V.11. Ekspresja Slug a ER, PR, HER2, Ki67, CTH

Oceńłam ekspresję Slug wyrażoną za pomocą parametru QS w zależności od obecności ER, PR, nadekspresji HER2, indeksu proliferacyjnego i zastosowania chemioterapii przedoperacyjnej. Wyniki przedstawiłam w tabeli 11.

Tabela 11. Wartość QS dla Slug a ER, PR, HER2, Ki67 oraz CTH.

| Slug | N | średnia ± SD | p |
|----------|----|--------------|------|
| ER (-) | 11 | 6,18 ± 2,44 | 0,55 |
| ER (+) | 54 | 5,52 ± 3,10 | |
| PR (-) | 12 | 7,17 ± 1,80 | 0,06 |
| PR (+) | 53 | 5,28 ± 3,11 | |
| HER2 (-) | 55 | 5,71 ± 3,07 | 0,72 |
| HER2 (+) | 10 | 5,20 ± 2,66 | |
| Ki67≤20% | 30 | 5,90 ± 2,98 | 0,45 |
| Ki67>20% | 35 | 5,40 ± 3,03 | |
| CTH nie | 58 | 5,43 ± 3,05 | 0,08 |
| CTH tak | 7 | 7,29 ± 1,89 | |

Parametr QS dla Slug nie różnił się istotnie w zależności od kategorii ER, PR, HER2, Ki67, CTH ($p>0,05$).

V.12. Ekspresja Snail a ER, PR, HER2, Ki67, CTH

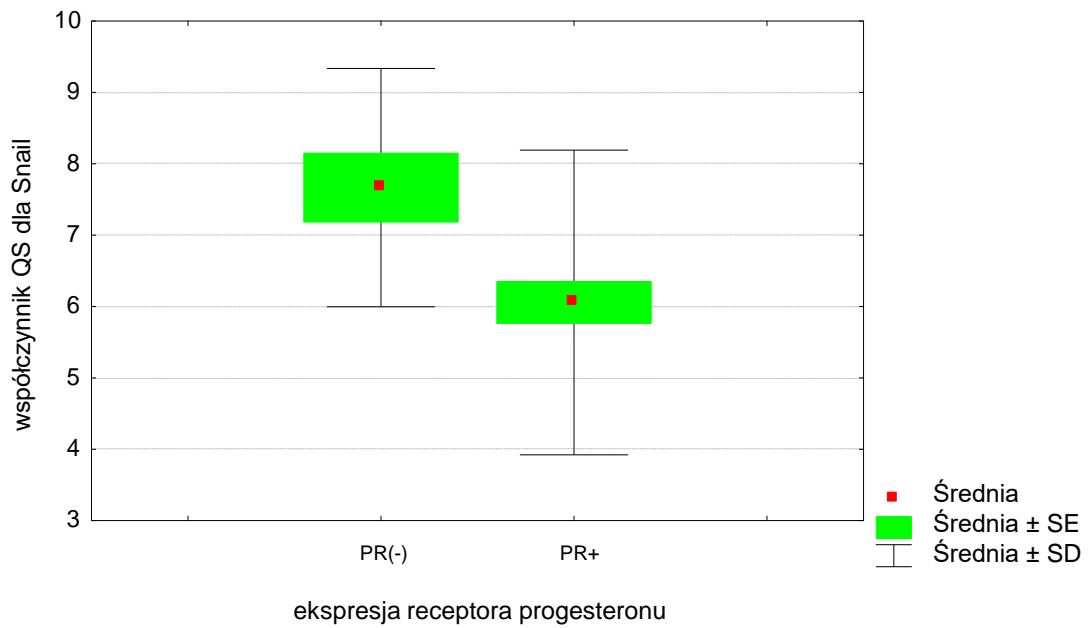
Oceńłam ekspresję Snail wyrażoną za pomocą parametru QS w zależności od obecności ER, PR, nadekspresji HER2, indeksu proliferacyjnego i zastosowania chemioterapii przedoperacyjnej. Wyniki przedstawiłam w tabeli 12.

Tabela 12. Wartość QS dla Snail a ER, PR, HER2, Ki67 oraz CTH.

| Snail | N | średnia ± SD | p |
|------------|----|--------------|-------------|
| ER (-) | 11 | 7,45 ± 1,81 | 0,18 |
| ER (+) | 54 | 6,13 ± 2,15 | |
| PR (-) | 12 | 7,67 ± 1,67 | 0,04 |
| PR (+) | 53 | 6,06 ± 2,13 | |
| HER2 (-) | 55 | 6,51 ± 2,07 | 0,19 |
| HER2 (+) | 10 | 5,50 ± 2,42 | |
| Ki67 ≤ 20% | 30 | 6,57 ± 2,14 | 0,20 |
| Ki67 > 20% | 35 | 6,17 ± 2,15 | |
| CTH nie | 58 | 6,16 ± 2,08 | 0,06 |
| CTH tak | 7 | 8,00 ± 2,00 | |

Stwierdziłam, że ekspresja Snail jest istotnie niższa w rakach piersi wykazujących ekspresję receptora progesteronu [PR (+)] ($p=0,04$). Wartość współczynnika QS dla ekspresji Snail w zależności od ekspresji receptora progesteronu w raku piersi przedstawiłam w postaci graficznej na rycinie 10.

Rycina 10. Ekspresja Snail a PR.



V.13. Ekspresja wimentyny a ER, PR, HER2, Ki67, CTH

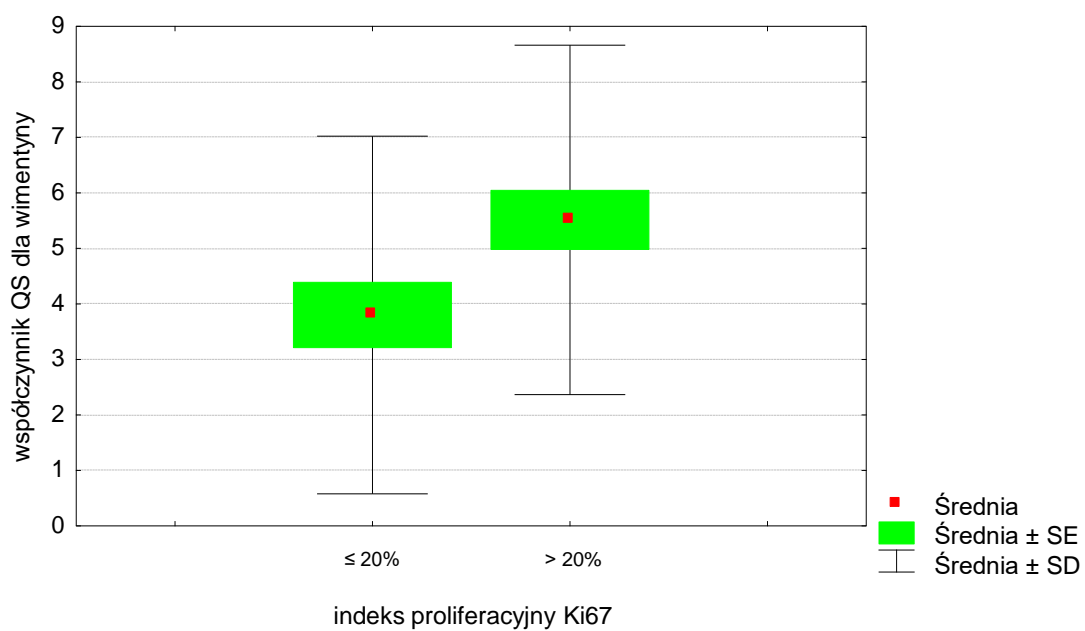
Oceńłam ekspresję wimentyny wyrażoną za pomocą parametru QS w zależności od obecności ER, PR, nadekspresji HER2, indeksu proliferacyjnego i zastosowania chemioterapii przedoperacyjnej. Wyniki przedstawiłam w tabeli 13.

Tabela 13. Wartość QS dla wimentyny a ER, PR, HER2, Ki67 oraz CTH.

| Wimentyna | N | średnia ± SD | p |
|------------|----|--------------|-------------|
| ER (-) | 11 | 5,00 ± 2,57 | 0,42 |
| ER (+) | 54 | 4,67 ± 3,41 | |
| PR (-) | 12 | 4,67 ± 2,10 | 0,61 |
| PR (+) | 53 | 4,74 ± 3,50 | |
| HER2 (-) | 55 | 4,51 ± 3,31 | 0,13 |
| HER2 (+) | 10 | 5,90 ± 2,92 | |
| Ki67 ≤ 20% | 30 | 3,80 ± 3,22 | 0,01 |
| Ki67 > 20% | 35 | 5,51 ± 3,15 | |
| CTH nie | 58 | 4,88 ± 3,40 | 0,77 |
| CTH tak | 7 | 3,43 ± 1,51 | |

Stwierdziłam, że ekspresja wimentyny jest istotnie wyższa w rakach piersi o indeksie proliferacyjnym Ki67 > 20% ($p=0,01$). Wartość współczynnika QS dla ekspresji wimentyny w zależności od wartości indeksu proliferacyjnego Ki67 w raku sutka przedstawiłam w postaci graficznej na rycinie 11.

Rycina 11. Ekspresja wimentyny a Ki67.



VI. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

- ✓ Wykazałam brak ekspresji E-kadheryny w komórkach rakowych w guzie pierwotnym w przypadku zajęcia przerzutami więcej niż 10 węzłów chłonnych ($p=0,04$).
- ✓ Stwierdziłam, że ekspresja E-kadheryny jest istotnie niższa w raku zrazikowym w porównaniu do raka przewodowego ($p=0,0001$). W przypadku ekspresji Slug w raku zrazikowym wyniki były istotnie wyższe w porównaniu do raka przewodowego piersi ($p=0,03$).
- ✓ Wykazałam, że ekspresja Snail jest istotnie niższa w rakach PR plus ($p=0,04$).
- ✓ Wykazałam istotnie statystycznie niższą ekspresję wimentyny w rakach luminalnych A w stosunku do pozostałych typów molekularnych raków w badanej grupie ($p=0,02$). Jednocześnie wykazałam istotnie statystycznie wyższą ekspresję wimentyny w rakach luminalnych B HER2 plus w stosunku do pozostałych typów molekularnych raków ($p=0,04$).
- ✓ Stwierdziłam, że ekspresja wimentyny jest istotnie wyższa w rakach o indeksie proliferacyjnym Ki67 > 20% ($p=0,02$).
- ✓ Nie wykazałam związku ekspresji badanych markerów w kategoriach przedziału wiekowego badanych kobiet ($p>0,05$).
- ✓ Nie wykazałam związku pomiędzy ekspresją badanych markerów a średnicą guza ($p>0,05$).
- ✓ W analizowanych przypadkach nie stwierdziłam obecności przerzutów odległych. Z tego względu wynik nie został poddany analizie statystycznej.
- ✓ Nie wykazałam zależności pomiędzy stopniem histologicznej złośliwości raka a ekspresją badanych markerów ($p>0,05$).
- ✓ Ekspresja badanych markerów nie różniła się istotnie w kategoriach obecności angioinwazji ($p>0,05$).
- ✓ Nie wykazałam związku między ekspresją E-kadheryny a ER, PR, HER2, Ki67 oraz CTH ($p>0,05$).
- ✓ Ekspresja N-kadheryny nie różniła się istotnie w kategoriach ER, PR, HER2, Ki67, CTH ($p>0,05$).
- ✓ Nie wykazałam związku między ekspresją Slug a ER, PR, HER2, Ki67 oraz CTH ($p>0,05$).

VII. DYSKUSJA

Celem niniejszej pracy była ocena ekspresji wybranych markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej, tj. E-kadheryny, N-kadheryny, Slug, Snail oraz wimentyny w komórkach raka piersi oraz określenie związku ich ekspresji z parametrami kliniczno-morfologicznymi o znaczeniu rokowniczym (wiekiem w chwili rozpoznania, średnicą guza, stanem węzłów chłonnych pachowych, obecnością przerzutów odległych, typem histologicznym nowotworu, stopniem histologicznej złośliwości, obecnością angioinwazji, typem molekularnym, obecnością receptorów PR, ER, białka HER2, indeksem proliferacyjnym oraz zastosowaniem chemioterapii przedoperacyjnej). Wyniki dotychczasowych badań wyróżniają kilka markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej wśród nich markery nabłonkowe np. E-kadheryna oraz mezenchymalne np. N-kadheryna, Slug, Snail i wimentyna.

VII.1. Znaczenie EMT

Inwazja raka oznacza naciekanie miejscowe oraz dawanie odległych przerzutów. Jednak mimo swojego klinicznego znaczenia, jest wciąż mało poznanym procesem z punktu widzenia zjawisk na poziomie komórek [46]. Istnieje także coraz więcej dowodów na udział przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej w procesie przerzutowania [47].

Wyniki wielu badań wskazują, iż EMT w guzach jest powiązana z inwazją, przerzutami oraz opornością na chemioterapię. Zarówno EMT jak i MET są dynamicznymi procesami podczas progresji raka. W raku piersi wykazano związek między EMT a opornością na tamoksyfen oraz trastuzumab [48,49].

Zmniejszenie adhezji komórek nowotworowych zależnej od E-kadheryny powoduje zwiększenie ich ruchliwości, dzięki czemu mogą one przenikać do otaczających tkanek [50,51]. E-kadheryna jako jeden z markerów EMT mogłaby zostać wykorzystana jako czynnik prognostyczny [52,53,54].

Podczas EMT komórki nabłonkowe tracą połączenia międzykomórkowe, nabierają morfologicznych i molekularnych cech komórek mezenchymalnych i są zdolne do migracji. W trakcie EMT komórka zyskuje wrzecionowaty kształt [55-59].

EMT jest też niezbędna do prawidłowego funkcjonowania tkanek i narządów. Proces ten jest opisywany w przebiegu embriogenezy [60], w tkankach skóry czy przewodu pokarmowego [61]. Ponadto odgrywa rolę w zapaleniach, włóknieniu [61].

Zarazem EMT jak i MET są procesami wymaganymi do skomplikowanego modelowania ciała i morfogenezy [62]. Komórki nabłonkowe zapewniają utrzymanie integralności organizmu wielokomórkowego [63]. Epitelializacja zachodzi już u zarodka, podczas tworzenia blastuli [64,65]. W zapewnieniu elastyczności tkanek udział biorą komórki mezenchymalne [66,67]. Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna odgrywa rolę nie tylko w trakcie embriogenezy, ale pozwala na dynamiczną przebudowę komórek podczas gojenia się ran i pełną regenerację tkanek [68]. Umożliwia ona proces gastrulacji, tworzenie grzebienia nerwowego [69], tworzenie zastawek serca [70], proces nefrogenezy [71] i miogenezy [72]. W warunkach patologicznych proces EMT został opisany w raku piersi [73], jajnika [74], okrężnicy [75] czy przełyku [76]. Rokowanie u chorych na raka piersi jest ściśle skorelowane z możliwością tworzenia przerzutów [77]. Mechanizmy dzięki którym nabłonkowe komórki nowotworowe mogą skolonizować odległe miejsca nie są do końca poznane. Wyniki jednych z ostatnich badań dowiodły udziału EMT w tym procesie [78]. Fenotyp komórek nabłonkowych po przejściu nabłonkowo-mezenchymalnym może być nie do odróżnienia od fenotypu fibroblasta. W zależności od mikrośrodowiska proces EMT może się cofnąć [79]. Obecnie stosuje się środki chemioterapeutyczne, które są ukierunkowane na komórki, które przeszły EMT i wykazują zwiększone zdolności inwazji [80,81]. Czynniki transkrypcyjne jak Snail, Slug czy Twist są powiązane ze złym rokowaniem w raku piersi i krótszym czasem przeżycia [82,83,84]. Rodzina białek typu palców cynkowych tj. Snail, Slug, Zeb, Twist oraz rodzina czynników transkrypcyjnych, to główne czynniki regulujące proces EMT [83,84]. Są one także odpowiedzialne za obniżoną ekspresję E-kadheryny. Snail, Twist oraz Slug są najbardziej znaczącymi induktorami EMT w komórkach nowotworowych [85-97]. Regulują one stabilność połączeń zamykających [89], ekspresję białek połączeń typu gap [90], rozkład desmosomów [91] oraz ekspresję proteaz [92].

VII.2. Ekspresja EMT a parametry kliniczno-morfologiczne raków piersi

Stan węzłów chłonnych jest uważany za jeden z najmocniejszych czynników rokowniczych w raku piersi. Ryzyko zgonu rośnie wraz z liczbą zajętych przerzutami węzłów chłonnych. U pacjentek bez obecności przerzutów w węzłach pięcioletnie przeżycie wynosi

około 72%. Z kolei w przypadku obecności przerzutów w 6-10 węzłach, odsetek ten maleje do 40% [2,3]. W moich badaniach stwierdziłam brak ekspresji E-kadheryny w guzie pierwotnym w przypadku zajęcia przerzutami więcej niż 10 węzłów chłonnych ($p=0,04$). Ekspresja E-kadheryny jest istotna dla inwazji nowotworu. Obniżony jej poziom stwierdza się w raku zrazikowym piersi czy w rozlanym raku żołądka [78,95]. E-kadheryna jest markerem nabłonkowym, jej podwyższony poziom występuje głównie w komórkach nienowotworowych, w których nie doszło jeszcze do przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej. Taka komórka bez fenotypu mezenchymalnego (komórki wrzecionowatej) ma obniżoną zdolność do przerzutowania. Zazwyczaj zajęcie większej liczby węzłów chłonnych występuje w nowotworach o wyższym stopniu histologicznej złośliwości, co może wskazywać na gorsze rokowanie. Dodatkowo w piśmiennictwie można znaleźć dane wskazujące na związek Snail z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Moody S. et al. podaje, iż ekspresja Snail w raku piersi nie jest skorelowana z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych ani z typem histologicznym nowotworu, wielkością guza i statusem HER2 [82]. Z kolei Blanco M. et al. opisuje, że im wyższy poziom ekspresji Snail tym samym większa jest liczba węzłów chłonnych z obecnością przerzutów [83]. Zatem autorzy wysunęli wniosek, iż Snail może być markerem prognostycznym w raku piersi. Podwyższony poziom ekspresji Slug jest związany z tworzeniem przerzutów do węzłów chłonnych, przerzutów odległych i nawrotem nowotworu [84]. Wyniki pracy Heatley M. et al. wskazują, że w przypadku podwyższonej ekspresji wimentyny tylko obecność przerzutów do węzłów chłonnych okazała się niezależnym czynnikiem prognostycznym [98].

EMT nie jest jedynym warunkiem dla wystąpienia przerzutów, ale może stanowić mechanizm zwiększający agresywność nowotworu. Ponadto występowanie EMT może wpływać na inne aspekty biologii raka, np. może zapewnić komórkom nowotworowym zdolność adaptacji do niskiego poziomu tlenu lub składników odżywczych [73].

W moich badaniach porównałam ekspresję wybranych markerów EMT w dwóch najczęstszych podtypach raka inwazyjnego piersi, tj. raku przewodowym i raku zrazikowym. Stwierdziłam, iż ekspresja E-kadheryny jest istotnie statystycznie niższa w raku zrazikowym w porównaniu do raka przewodowego ($p=0,0001$). Cechą komórek raka zrazikowego piersi jest dyskohezia co wiąże się z brakiem lub znacznie obniżoną ekspresją E-kadheryny. Wykazana przeze mnie niższa jej ekspresja w rakach zrazikowych podkreśla prawidłowość przeprowadzonej procedury immunohistochemicznej stosowanej w mojej pracy doktorskiej. Z kolei ekspresja Slug jest istotnie statystycznie wyższa w raku zrazikowym w porównaniu do raka przewodowego ($p=0,03$). Ekspresja Slug ma związek z obecnością przerzutów do

węzłów chłonnych i przerzutów odległych [97,99]. W przypadku raka zrazikowego przerzuty najczęściej występują do opon mózgowych, otrzewnej, przestrzeni zaotrzewnowej, przewodu pokarmowego, narządów płciowych czy kości. Zaś przerzuty wisceralne do płuc, wątroby są rzadsze niż w raku przewodowym [10].

Podobnie do wyników badań Micalizzi D. et al. stwierdziłam, że istnieje związek niektórych markerów EMT z typem histologicznym nowotworu i klasyfikacją molekularną. Wyniki innych badań wykazały podwyższony poziom markerów mezenchymalnych w rakach o wysokim stopniu histologicznej złośliwości oraz w typie molekularnym potrójnie negatywnych nowotworów [100].

Raki przewodowe są w większości ER pozytywne, PR pozytywne i w około 1/3 wykazują nadekspresję HER2, podczas gdy raki zrazikowe są zwykle ER pozytywne, PR pozytywne, ale nie wykazują nadekspresji HER2. W moich badaniach wykazałam, istotnie statystycznie niższą ekspresję wimentyny w rakach luminalnych A w stosunku do pozostałych typów molekularnych raków w badanej grupie ($p=0,02$). Jednocześnie wykazałam istotnie statystycznie wyższą ekspresję wimentyny w rakach luminalnych B HER2 plus w stosunku do pozostałych typów molekularnych raków ($p=0,04$).

Wimentyna jest cytoplazmatycznym filamentem białkowym stanowiącym komponent cytoszkieletu. Jest powiązana z kliniczną agresywnością nowotworów, co zostało to potwierdzone w licznych badaniach [101,102,103,104]. Według Hoiseon J. et al. ekspresja markerów mezenchymalnych jest charakterystyczna dla raków sutka potrójnie negatywnych oraz EMT wykazuje związek z typem molekularnym raka sutka [105]. Autorzy stwierdzili, iż ekspresja wimentyny, EGFR, oraz NF- κ B są znacząco podwyższone w raku potrójnie negatywnym. Ta wysoka ekspresja markerów EMT w rakach sutka potrójnie ujemnych może wyjaśniać różne biologiczne zachowanie tej grupy guzów [105,106,107].

W badaniu Hoiseon J. et al. opisali łącznie grupę 492 przypadków raków piersi (ER/PR dodatnich, HER2 pozytywnych i potrójnie negatywnych). Spośród 102 przypadków raków piersi potrójnie negatywnych (TN-type) 24,5% wykazywało ekspresję wimentyny, 13,7% ekspresję N-kadheryny oraz 9,8% ekspresję aktyny mięśniowej (SMA). Spośród 221 przypadków raków piersi z ekspresją receptorów hormonalnych (ER/PR dodatnich) tylko 4,1% wykazywało ekspresję wimentyny, 5,9% N-kadheryny oraz 0,4% SMA [100]. Ekspresja markerów nabłonkowych w potrójnie negatywnych rakach piersi była obniżona (ekspresja E-kadheryny w 16,7%, cytokeratyny 19 w 45,1% oraz cytokeratyny 8 i 18 w 60,8%) [100]. W rakach HR-type ekspresja E-kadheryny była obniżona w 11,8%, cytokeratyny 19 w 6,8% oraz cytokeratyny 8 i 18 w 3,2%. Z cytowanych wyników badań wynika, że ekspresja markerów

mezenchymalnych jest charakterystyczna dla raków piersi potrójnie negatywnych [100]. Niektórzy autorzy nie uważają ekspresję markerów mezenchymalnych w raku piersi za oznakę EMT [16]. Potwierdzają swoją tezę tym, że ekspresję wimentyny obserwowano również w niektórych rakach przewodowych *in situ*, które nie mają zdolności inwazji. Obecność ekspresji wimentyny w DCIS można również interpretować jako oznakę skłonności do EMT, a zatem komórki dodatnie na wimentynę są podatne na późniejsze nabycie dalszych markerów mezenchymalnych i zwiększony potencjał inwazyjny [16].

Raki luminalne B (HER2-) charakteryzują się ekspresją receptora estrogenów, brakiem nadekspresji receptora HER2 oraz brakiem lub niskimi poziomami ekspresji receptora progesteronu oraz wysokim indeksem proliferacyjnym Ki67. W moich badaniach wykazałam, iż ekspresja wimentyny jest istotnie statystycznie wyższa w typie luminalnym B (HER2+) ($p=0,04$) oraz w rakach z indeksem proliferacyjnym Ki67 większym niż 20% ($p=0,02$). Oceniona przeze mnie ekspresja białka Snail jest istotnie niższa w rakach PR dodatnich ($p=0,04$). Według Kuncman W. et al. raki typu luminalnego B to w klasyfikacji klinicznej raki z ekspresją ER, jednak cechujące się gorszym rokowaniem [22]. Wynika z tego, że poziom ekspresji markerów mezenchymalnych jest wysoki w rakach o większej złośliwości. Fenotyp z brakiem ekspresji PR wiąże się z ograniczoną odpowiedzią na leczenie hormonalne. W pracy Whittle M. et al określili receptory progesteronu jako potencjalne supresory EMT także w raku endometrium. Ekspresja PR w raku endometrium jest dobrym czynnikiem prognostycznym dla pacjentek i wiąże się ze skutecznym leczeniem za pomocą octanu medroksyprogesteronu (MPA). Wynika to z utraty ścieżki sygnałowej progesteronu. Wykazano, że leczenie MPA u pacjentów z modulacją PR zmniejsza ekspresję markerów mezenchymalnych [108,109].

W publikacji Aleskandarany M. et al. autorzy przedstawili wyniki badań na mikromacierzach tkankowych z panelem biomarkerów E-cad, N-cad, TGF β 1, PIK3CA, pAkt i inne. Zdefiniowano cztery grupy fenotypowe reprezentujące zmianę ekspresji kadheryny, w tym E-cad (+) / N-cad (-), E-cad (-) / N-cad (-), E-cad (+) / N-cad (+) i E-cad (-) / N-cad (+) [39]. Autorzy zauważyli statystycznie istotny związek między tymi fenotypami a typem histologicznym guza, średnicą guza oraz stopniem zaawansowania nowotworu. Zmiana E-cad / N-cad występowała częściej w klasie molekularnej raków potrójnie negatywnych, oraz w podtypie HER2 (+) niż w typie luminalnym A i B. Raki o wyższym stopniu histologicznej złośliwości, raki potrójnie negatywne i o większej średnicy miały głównie fenotyp E-cad (-) / N-cad (-) [39]. Ponadto autorzy wykazali zależność między ekspresją Snail a stopniem

histologicznej złośliwości raka piersi. Podwyższony poziom tego białka stwierdzono głównie w rakach o najwyższym stopniu złośliwości histologicznej (G3)[83].

W moich badaniach nie wykazałam zależności między ekspresją markerów EMT a średnicą guza, obecnością przerzutów odległych, stopniem histologicznej złośliwości. Parametr QS badanych markerów nie różnił się istotnie w kategoriach obecności angioinwazji, zastosowanej chemioterapii przedoperacyjnej oraz wieku pacjentek ($p > 0,05$). Dalsze badania nad markerami przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej mogą przyczynić się do wprowadzenia leczenia uniemożliwiającego przerzutowanie nowotworów złośliwych piersi.

VII.3. Rola EMT w innych zmianach nowotworowych i nienowotworowych

Proces EMT odgrywa rolę także w innych nowotworach złośliwych. Rak jelita grubego jest chorobą bardzo heterogenną. W badaniach opisano dwa główne typy molekularne raka okrężnicy: nabłonkowy i mezenchymalny [108]. Przerzuty raka jelita grubego mają niższy indeks proliferacyjny niż pierwotne nieprzerzutujące guzy. Wiąże się to z tym, iż zmiany przerzutujące mogą przechodzić przemianę mezenchymalno-nabłonkową. Dane potwierdzają również koncepcję, że typ mezenchymalny, powiązany jest z aktywacją TGF- β (TGF- β - *transforming growth factor- β*), odpowiedzialnym za zaawansowane stadium, niski stan różnicowania i odległe w czasie nawroty choroby [108]. Głównym regulatorem EMT jest TGF- β . Wpływa on na wzrost poziomu markerów mezenchymalnych takich jak Snail czy wimentyna oraz spadek poziomu markeru nabłonkowego, tj. E-kadheryny [109].

Wybiórcza utrata błony podstawnej (BM – *basement membrane*) w raku jelita grubego jest powiązana z EMT i odgrywa rolę w tworzeniu odległych przerzutów i skraca okres przeżycia. BM jest niezbędna do różnicowania nabłonkowego. Jej utrata może wywołać EMT. Pochodzące ze środowiska induktory utraty BM i EMT to cytokiny takie jak TGF- β czy TNF- α (TNF- α - *tumor necrosis factor- α*) [54]. EMT w komórkach raka jelita grubego jest związana z jądrową akumulacją β -kateniny. Odgrywa ona również rolę w tworzeniu komórek macierzystych. Jednocześnie obie sytuacje prowadzą to do progresji nowotworu złośliwego [75].

Niższa przeżywalność w rakach płuc czy trzustki jest również związana z EMT, co ma wpływ na oporność na zastosowane leczenie [109,110]. Wczesne i odległe przerzuty pozostają poważnym wyzwaniem dla skutecznego leczenia gruczolakoraka trzustki. Przy

obecnym braku badań przesiewowych dochodzi do późnego rozpoznania i większość pacjentów ostatecznie umiera na chorobę przerzutową. Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna odgrywa ważną rolę w tym procesie. Głównym regulatorem EMT jest TGF- β , który indukuje dimeryzację receptorów powierzchniowych promujących fosforylację SMAD, powoduje zwiększoną ekspresję markerów mezenchymalnych, takich jak Snail i wimentyny oraz obniżenie poziomu markerów nabłonkowych takie jak E-kadheryna [109]. Komórki nowotworowe w krążeniu muszą wykazywać wysoki stopień plastyczności aby wytrzymać obciążenia m.in. mechaniczne, które zagrażają ich przetrwaniu. Nabycie cech zwiększających ich ruchliwość i przetrwanie jest więc ściśle związane z EMT.

Uważa się, że EMT jest zaangażowana w patogenezę wielu chorób płuc począwszy od zaburzeń rozwojowych, zwłóknienia płuc aż po raka płuc. EMT wpływa na proces włóknienia w sercu, płucach, wątrobie czy nerkach [58]. W publikacjach opisano, iż wrażliwość na erlotynib (będący inhibitorem kinazy receptora EGFR) w niedrobnokomórkowym raku płuc związana jest z przejściem procesu EMT [58].

Ważnym pytaniem jest jakie jest znaczenie i wkład EMT w rozwój kilku przewlekłych chorób płuc (astma, przewlekłe obturacyjne choroby płuc, zarostowe zapalenie oskrzelików i zwłóknienie płuc) [110]. Choroby płuc przebiegające z przewlekłym zapaleniem powodują blizny, zwłóknienia i przebudowę tkanki płuca. Tym samym prowadzą do pogorszenia czynności płuc, niewydolności oddechowej i ostatecznie śmierci. W badaniach doświadczalnych na myszach wykryto, iż komórki nabłonkowe w astmie alergicznej czy zwłóknieniu płuc przeszły EMT jednocześnie zwiększając liczbę fibroblastów [110].

Stwierdzono, że wiele szlaków wyzwała EMT: tyrozyna, receptory kinaz (naskórkowy czynnik wzrostu, czynnik wzrostu fibroblastów, czynnik wzrostu tkanki łącznej, płytkopochodny czynnik wzrostu, insulinopodobny czynnik wzrostu itp.), integryny, Wnt, szlaki czynnika jądrowego NF- κ B i TGF- β . Wspólna cecha tych ścieżek molekularnych polega na tym, że aktywują one „główne czynniki transkrypcyjne” (Slug, Snail, Zeb-1, Twist itp.), które włączają program EMT w komórkach nabłonka. Aktywacja sygnalizacji Wnt i β -kateniny sprawia, że komórki nabłonka stają się podatne na EMT indukowaną przez TGF- β . Uważa się, że cytokiny zapalne aktywujące NF- κ B dodatkowo nasilają włóknienie i EMT w płucach [110].

Wyniki badań wskazują, że EMT przyczynia się do inwazji raka i tworzenia przerzutów poprzez umożliwienie migracji złośliwie transformowanych komórek nabłonka, które atakują otaczający je zrąb i rozprzestrzeniają się drogą naczyń krwionośnych i limfatycznych do odległych miejsc. Poprzez proces EMT komórki rakowe nie tylko tracą

swoje połączenia komórkowe i wykazują zwiększoną ruchliwość i inwazję, ale także zwiększają odporność na apoptozę, leki chemioterapeutyczne, a nawet rozwijają właściwości podobne do komórek macierzystych [110,111]. Zgodnie z obecnymi poglądami, EMT ma znaczenie prognostyczne w przypadku różnych rodzajów raka co jest silnie skorelowane z inwazyjnym fenotypem i zdolnością do tworzenia przerzutów. Ten tak zwany „fenotyp EMT” jest pierwotnym wyznacznikiem rokowania. Zostało to wykazane m.in. w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc. Jednak pomimo rosnącej liczby badań nadal nie ma bezpośredniego dowodu, iż EMT faktycznie zachodzi jako dynamiczny proces i przyczynia się do tworzenia przerzutów raka [110].

Rak wątrobowokomórkowy (*HCC – hepatocellular cancer*) wykazuje heterogenność na poziomie komórkowym w wyniku transformacji nowotworowej hepatocytów i komórek progenitorowych, które są komórkami nabłonkowymi. Heterogenność komórkowa jest zwiększona przez zmiany plastyczności tych komórek nabłonka, powszechnie określane jako przemiana nabłonkowo-mezenchymalna. TGF- β jest ważnym czynnikiem inicjującym EMT w przypadku włóknienia w wątrobie jak i raka wątrobowokomórkowego [111,112]. Podkreśla się także rolę Snail jako znaczącego induktora EMT w HCC. Nie ma wątpliwości, że EMT odgrywa kluczową rolę w rozwoju HCC, podczas gdy kwestia ta jest nadal kontrowersyjna w przypadku włóknienia wątroby. U dorosłych komórki wątroby mogą przechodzić procesy EMT czy MET, które tym samym mogą brać udział w regeneracji wątroby [68]. Zatem regulatory EMT mogą być potencjalnym celem terapeutycznym w HCC [112,113].

Identyfikacja biomarkerów związanych z EMT jest dość trudnym procesem. Badania ukierunkowane na nowe terapie obejmują cząsteczki indukujące EMT, takie jak c-Met i TGF- β . Badania te mogą dostarczyć ważnych dowodów mogących rzucić światło na proces EMT i zrozumieć jego kliniczną rolę. W medycynie spersonalizowanej c-Met okazał się ważny w lepszym przewidywaniu pomyślnego wyniku klinicznego w leczeniu raka jelita grubego [108]. Zgodnie z badaniami przypuszcza się, że pacjenci z wysokim stężeniem TGF- β i niskim stężeniem E-kadheryny będą mieli gorsze rokowanie. Ta podgrupa pacjentów najprawdopodobniej odniesie korzyści z terapii hamującej szlak TGF- β . EMT pełni ważną rolę w rozwoju embrionalnym jak również w inwazji i tworzeniu przerzutów nowotworowych. W raku jajnika EMT jest indukowana przez TGF- β , EGF (*EGF – epidermal growth factor*), HGF (*HGF – hepatocyte growth factor*) i ET-1 (*ET-1 – endothelin-1*). Substancje wpływające na te szlaki komórkowe mogą zostać użyte w leczeniu raka jajnika [74].

W badaniach nad rakiem płaskonabłonkowym przełyku odkryto, iż zwiększona ekspresja białka Snail jest związana z podwyższoną ekspresją wimentyny i zmniejszeniem poziomu E-kadheryny. Wpływa to jednocześnie na tworzenie przerzutów drogą naczyń limfatycznych do węzłów chłonnych oraz drogą naczyń krwionośnych i ma związek z wyższym stopniem zaawansowania nowotworu [76].

Zrozumienie biologii EMT i wykorzystanie najnowszych technologii może pomóc w leczeniu nowotworów złośliwych i tym samym może mieć wpływ na wydłużenie przeżywalności pacjentów [113].

VIII. WNIOSKI

1. Utrata ekspresji jednego z markerów nabłonkowych (E-kadheryny) przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej może mieć związek ze zwiększoną inwazyjnością raka piersi w zakresie przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.
2. Ekspresja wybranych markerów mezenchymalnych (Slug, Snail, wimentyny) przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej stanowi dodatkową charakterystykę molekularną raków piersi.
3. Markery przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej mogą w przyszłości stać się celem terapii redukujących zdolność raka piersi do dawania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

IX. STRESZCZENIE

Wstęp:

W Polsce rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet, a współczynnik zachorowalności na niego systematycznie rośnie. Rak piersi jest klinicznie i patologicznie niejednorodną chorobą. Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna (EMT) jest procesem fizjologicznym, który również odgrywa rolę w patologii m.in. w tworzeniu przerzutów nowotworowych. EMT jest złożonym programem, w którym komórki nabłonkowe mogą uzyskać fenotyp mezenchymalny i ruchliwość poprzez kaskadę zdarzeń biologicznych. Wśród różnych markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej wyróżnić można nabłonkowe (m.in. E-kadheryna) i mezenchymalne (m.in. N-kadheryna, Slug, Snail, wimentyna).

Cel pracy:

Ocena ekspresji markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej, tj. E-kadheryny, N-kadheryny, Slug, Snail i wimentyny w komórkach naciekającego raka piersi oraz ich korelacja z parametrami kliniczno-morfologicznymi i klasyfikacją molekularną raka piersi.

Material i metody:

Badania przeprowadziłam na materiale tkankowym od 65 pacjentek, u których wykonano całkowitą mastektomię z powodu pierwotnego naciekającego raka sutka. Grupa badana została scharakteryzowana według następujących parametrów kliniczno-morfologicznych: wiek w chwili rozpoznania, średnica guza, obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachowych, obecność przerzutów odległych, typ histologiczny raka, stopień złośliwości histologicznej, obecność angioinwazji, typ molekularny raka, ekspresja receptorów ER, PR, HER2, indeks proliferacyjny (Ki67) oraz zastosowanie chemioterapii przedoperacyjnej (CTH). Z materiału tkankowego zatopionego w bloczkach parafinowych zostały sporządzone macierze tkankowe. Ekspresja białek E-kadheryny, N-kadheryny, Slug, Snail i wimentyny została oznaczona metodą immunohistochemiczną. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przyjmując za poziom istotności $p < 0,05$.

Wyniki:

W swoich badaniach wykazałam:

- brak ekspresji E-kadheryny w komórkach rakowych w guzie pierwotnym w przypadku obecności przerzutów raka w więcej niż 10 węzłów chłonnych, jednocześnie ekspresja E-kadheryny jest istotnie niższa w raku zrazikowym w porównaniu do raka przewodowego,
- istotnie wyższą ekspresję Slug w raku zrazikowym w stosunku do raka przewodowego,
- istotnie niższą ekspresję Snail w rakach piersi wykazujących ekspresję receptora progesteronu,
- istotnie wyższą ekspresję wimentyny w rakach piersi o indeksie proliferacyjnym Ki67 > 20%.
- istotnie niższą ekspresję wimentyny w rakach luminalnych A w stosunku do pozostałych typów molekularnych raków a jednocześnie istotnie wyższą w rakach luminalnych B HER2-plus.

Nie wykazałam różnic w ekspresji badanych markerów EMT w kategoriach przedziału wiekowego badanych kobiet, średnicy guza, stopnia histologicznej złośliwości raka, obecności angioinwazji czy zastosowanej CTH.

Wnioski:

- ✓ Utrata ekspresji jednego z markerów nabłonkowych (E-kadheryny) przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej może mieć związek ze zwiększoną inwazyjnością raka piersi w zakresie przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.
- ✓ Ekspresja wybranych markerów mezenchymalnych (Slug, Snail, wimentyny) przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej stanowi dodatkową charakterystykę molekularną raków piersi.
- ✓ Markery przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej mogą w przyszłości stać się celem terapii redukujących zdolność raka piersi do dawania przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

X. SUMMARY

Introduction:

Breast cancer is the most common malignant carcinoma among women in Poland and its incidence is increasing. Breast cancer is a non-homogenous disease, both clinically and pathologically. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a physiological process which also can play a role in a formation of metastases. EMT is a complex program in which epithelial cells may acquire mesenchymal phenotype and mobility through the cascade of biological events. Several markers of epithelial-mesenchymal transition are found and studied, which are divided into epithelial (i.a. E-cadherin) and mesenchymal (i.a. N-cadherin, Slug, Snail, Vimetin) ones.

Aim of the study:

Assessment of expression of epithelial-mesenchymal transition markers, i.e. E-cadherin, N-cadherin, Slug, Snail and Vimetin in cells of invasive breast cancer and their correlation with the clinical and morphological parameters as well as molecular classification.

Materials and methods:

The study was carried out on the tissue material from 65 patients who underwent full mastectomy due to the invasive primary breast cancer. The study group was characterised according to the following clinico-morphological parameters: age at time of diagnosis, tumour diameter, metastases in the axillary lymph nodes, distant metastases, histological type of cancer, cancer grade, angioinvasion, molecular classification of cancer, expression of ER, PR, HER2 receptors, proliferation index (Ki67) as well as administration of neoadjuvant chemotherapy (CTH). Tissue microarrays were constructed from the tissue sample embedded in the paraffin blocks. E-cadherin, N-cadherin, Slug, Snail and Vimetin expression was detected immunohistochemically and analyzed with image analysis software. Obtained results were subjected to the statistical analysis applying $p < 0,05$ statistical significance level.

Results:

Results of my research are as followed:

- Expression of E-cadherin in the breast cancer cells in the primary tumours is significantly lower in case of cancer metastases in more than 10 lymph nodes, simultaneously expression of E-cadherin is significantly lower in case of lobular carcinoma than in invasive duct carcinoma,
- Slug expression is significantly higher in lobular carcinoma than in invasive duct carcinoma,
- Snail expression is significantly lower in breast cancer with progesterone receptor expression,
- Vimetin expression is significantly higher in breast carcinoma with the Ki67>20% proliferation index,
- Vimetin expression in the luminal A cancers is significantly lower than in case of other molecular carcinomas but at the same time, it is statistically significantly higher in luminal carcinoma B HER2-plus.

No differences in the expression of analyzed EMT markers and women age, tumour diameter, cancer grade, angioinvasion or administration of CHT were found.

Conclusions:

- ✓ Loss of expression of one epithelial EMT marker (E-cadherin) may be related to increased invasiveness of breast cancer in term of metastases to local lymphnodes.
- ✓ Expression of selected mesenchymal EMT (Slug, Snail, Vimentin) is additional molecular characteristic of breast cancers.
- ✓ Markers of EMT may be a target of therapies reducing metastatic potential of breast cancer to local lymphnodes.

XI. PIŚMIENNICTWO

1. Krzakowski M, Potemski P, Warzocha K, i in. Onkologia kliniczna. Tom II. Wydawnictwo: Via Medica, Gdańsk 2015.
2. Stachura J, Domagała W. Patologia znaczy słowo o chorobie. Tom II. Wydawnictwo: Polska Akademia Umiejętności, Kraków 2019.
3. Aster J, Abbas A, Kumar V. Robbins Basic Pathology 9th Edition. Wydawnictwo: Elsevier Science Publishers, 2012.
4. Balakrishnan S, Bhat FA, Raja Singh P, et al. Gold nanoparticle-conjugated quercetin inhibits epithelial-mesenchymal transition, angiogenesis and invasiveness via EGFR/VEGFR-2-mediated pathway in breast cancer. *Cell Prolif.* 2016; 49(6):678-697.
5. Brabletz T. EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells? *Cancer Cell.* 2012; 22(6):699-701.
6. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003; 112(12):1776-1784.
7. Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, et al. EMT in Breast Carcinoma-A Review. *J Clin Med.* 2016; 5(7):65.
8. Liu F, Gu LN, Shan BE, et al. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update. *Oncol Lett.* 2016; 12(6):4869-4876.
9. Polyak JX, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignancy and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9:265-273.
10. Hoda S, Brogi E, Koerner F, et al. Rosen's Breast Pathology. Wydawnictwo: Wolters Kluwer, Philadelphia 2014.
11. Wysocka J. Nowa klasyfikacja WHO guzów piersi – wydanie z 2019 roku. *Via Medica* 2020: 341-343.
12. Breast Tumours, WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Ed. WHO Classification Editorial Board, 2019.
13. Gurzu S, Turdean S, Kovecsi A, et al. Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: An update. *World J Clin Cases.* 2015; 3(5):393-404.
14. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus

- on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011; 22(8):1736-1747.
15. Sethi S, Sarkar FH, Ahmed Q, et al. Molecular markers of epithelial-to-mesenchymal transition are associated with tumor aggressiveness in breast carcinoma. *Transl Oncol.* 2011; 4(4):222-6.
 16. Sarrió D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 2008; 68(4):989-97.
 17. Yang J, Eddy JA, Pan Y, et al. Integrated proteomics and genomics analysis reveals a novel mesenchymal to epithelial reverting transition in leiomyosarcoma through regulation of slug. *Mol Cell Proteomics.* 2010; 9(11):2405-13.
 18. Pieniążek M, Donizy P, Ziętek M, i in. Rola szlaków sygnalizacyjnych związanych z TGF-beta w patogenezie przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT) jako głównego elementu warunkującego progresję choroby nowotworowej. *Postepy Hig Med Dosw.* 2012; 66:583-591.
 19. Zhu QC, Gao RY, Wu W, Qin HL. Epithelial-mesenchymal transition and its role in the pathogenesis of colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(5):2689-98.
 20. Devarajan E, Song YH, Krishnappa S, Alt E. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer lines is mediated through PDGF-D released by tissue-resident stem cells. *Int J Cancer.* 2012; 131(5):1023-31.
 21. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119(6):1420-8.
 22. Kuncman W, Braun M, Kordek R. Znaczenie receptora progesteronowego w luminalnych rakach piersi. *NOWOTWORY Journal of Oncology.* 2015; 65(5):383-388.
 23. Wang Y, Zhou BP. Epithelial-mesenchymal Transition – A Hallmark of Breast Cancer Metastasis. *Cancer Hallm.* 2013; 1(1):38-49.
 24. Rosai J. Surgical Pathology. 10th Edition. Wydawnictwo: Elsevier. USA/UK 2011.
 25. Elghonaimy EA, Ibrahim SA, Youns A, et al. Secretome of tumor-associated leukocytes augment epithelial-mesenchymal transition in positive lymph node breast cancer patients via activation of EGFR/Tyr845 and NF-κB/p65 signaling pathway. *Tumour Biol.* 2016; 37(9):12441-12453.
 26. Zheng M, Jiang YP, Chen W, et al. Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2015; 6(9):6797-810.

27. Micati DJ, Hime GR, McLaughlin EA, et al. Differential expression profiles of conserved Snail transcription factors in the mouse testis. *Andrology*. 2018; 6(2):362-373.
28. Bai JW, Chen MN, Wei XL, et al. The zinc-finger transcriptional factor Slug transcriptionally downregulates ER α by recruiting lysine-specific demethylase 1 in human breast cancer. *Oncogenesis*. 2017; 6(5):e330.
29. Pulkka OP, Nilsson B, Sarlomo-Rikala M, et al. SLUG transcription factor: a pro-survival and prognostic factor in gastrointestinal stromal tumour. *Br J Cancer*. 2017; 116(9):1195-1202.
30. Kusinska RU, Kordek R, Pluciennik E, et al. Does vimentin help to delineate the so-called 'basal type breast cancer'? *J Exp Clin Cancer Res*. 2009; 28(1):118.
31. Chen Z, Fang Z, Ma J. Regulatory mechanisms and clinical significance of vimentin in breast cancer. *Biomed Pharmacother*. 2021; 133:111068.
32. Domagala W, Lasota J, Bartkowiak J, et al. Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. *Am J Pathol*. 1990; 136(1):219-227.
33. Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci*. 2001; 114(Pt 4):629-41.
34. Bhandari A, Zheng C, Sindan N, et al. COPB2 is up-regulated in breast cancer and plays a vital role in the metastasis via N-cadherin and Vimentin. *J Cell Mol Med*. 2019; 23(8):5235-5245.
35. Kaszak I, Witkowska-Piłaszewicz O, Niewiadomska Z, et al. Role of Cadherins in Cancer – A Review. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(20):7624.
36. Wong SHM, Fang CM, Chuah LH, et al. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018; 121:11-22.
37. Corso G, Figueiredo J, De Angelis SP, et al. E-cadherin deregulation in breast cancer. *J Cell Mol Med*. 2020; 24(11):5930-5936.
38. Blick T, Hugo H, Widodo E, et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines parallel the CD44(hi/) CD24(lo/-) stem cell phenotype in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15(2):235-252.
39. Aleskandarany MA, Negm OH, Green AR, et al. Epithelial mesenchymal transition in early invasive breast cancer: an immunohistochemical and reverse phase protein array study. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 145(2):339-48.

40. Foroni C, Broggin M, Generali D, Damia G. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev.* 2012; 38(6):689-97.
41. Koerner F. Diagnostic problems in breast pathology. Wydawnictwo: Saunders Elsevier. Philadelphia 2009.
42. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci.* 2010; 101(2):293-9.
43. Creighton CJ, Chang JC, Rosen JM. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010; 15(2):253-60.
44. Carvalho ST, Stiepcich MM, Fregnani JH, et al. Evaluation of prognostic factors in stage IIA breast tumors and their correlation with mortality risk. *Clinics (Sao Paulo).* 2011; 66(4):607-12.
45. Dongre A, Rashidian M, Reinhardt F, et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Contributes to Immunosuppression in Breast Carcinomas. *Cancer Res.* 2017; 77(15):3982-3989.
46. Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(12):2153-60.
47. Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature.* 2006; 441(7092):444-50.
48. Ye X, Tam WL, Shibue T, et al. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature.* 2015; 525(7568):256-60.
49. Oliveras-Ferreros C, Corominas-Faja B, Cufí S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle.* 2012; 11(21):4020-4032.
50. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 2005; 17(5):548-58.
51. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7(2):131-42.
52. Peinado H, Cano A. New potential therapeutic targets to combat epithelial tumor invasion. *Clin Transl Oncol* 2006; 8:851-857.
53. Bellovin DI, Simpson KJ, Danilov T, et al. Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. *Oncogene.* 2006; 25(52):6959-67.

54. Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, et al. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2006; 131(3):830-40.
55. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 2007; 39(3):305-18.
56. Damonte P, Gregg JP, Borowsky AD, et al. EMT tumorigenesis in the mouse mammary gland. *Lab Invest*. 2007; 87(12):1218-26.
57. Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, et al. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer--observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs*. 2007; 185(1-3):191-203.
58. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol*. 2006; 172(7):973-81.
59. Trimboli AJ, Fukino K, de Bruin A, et al. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res*. 2008; 68(3):937-45.
60. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(6):442-54.
61. Gavert N, Ben-Ze'ev A. Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med*. 2008; 14(5):199-209.
62. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010; 15(2):117-134.
63. Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev*. 2003; 120(11):1351-83.
64. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn*. 2006; 235(9):2301-14.
65. Muller H. Of mice, frogs and flies: generation of membrane asymmetries in early development. *Dev Growth Differ*. 2001; 43(4):327-42.
66. Solnica-Krezel L. Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation. *Curr Biol*. 2005; 15(6):R213-28.
67. Hay E. The mesenchymal cell, its role in the embryo and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn*. 2005; 233(3):706-20.
68. Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology*. 2009; 50(6):2007-13.

69. Tucker RP. Neural crest cells: a model for invasive behavior. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(2):173-7.
70. Mercado-Pimentel ME, Runyan RB. Multiple transforming growth factor-beta isoforms and receptors function during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Cells Tissues Organs.* 2007; 185(1-3):146-56.
71. Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs.* 2007; 185(1-3):7-19.
72. Birchmeier C, Brohmann H. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2000; 12(6):725-30.
73. Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br.J.Cancer* 2008; 99:1375-1379.
74. Vergara D, Merlot B, Lucot JP, et al. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2010; 291(1):59-66.
75. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, et al. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs.* 2005; 179(1-2):56-65.
76. Usami Y, Satake S, Nakayama F, et al. Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression. *J Pathol.* 2008; 215(3):330-9.
77. Woodward WA, Strom EA, Tucker SL, et al. Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol.* 2003; 21(17):3244-8.
78. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009; 119(6):1429-37.
79. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell.* 2006; 10(6):515-527.
80. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell.* 2009; 138(4):645-659.
81. Creighton CJ, Li X, Landis M, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(33):13820-5.
82. Moody SE, Perez D, Pan TC, et al. The transcriptional repressor Snail promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell.* 2005; 8(3):197-209.

83. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*. 2002; 21(20):3241-6.
84. Martin TA, Goyal A, Watkins G, et al. Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2005; 12(6):488-96.
85. Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*. 2008; 27(55):6958-69.
86. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(6):415-28.
87. Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, et al. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci*. 2003; 116(Pt 3):499-511.
88. Georgakopoulos-Soares I, Chartoumpakis DV, Kyriazopoulou V, Zaravinos A. EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. *Front Oncol*. 2020; 10:499.
89. Vesuna F, van Diest P, Chen JH, Raman V. Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 367(2):235-241.
90. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci*. 2003; 116(Pt 10):1959-67.
91. De Boer TP, van Veen TA, Bierhuizen MF, et al. Connexin43 repression following epithelium-to-mesenchyme transition in embryonal carcinoma cells requires Snail1 transcription factor. *Differentiation*. 2007; 75(3):208-18.
92. Savagner P, Yamada KM, Thiery JP. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*. 1997; 137(6):1403-1419.
93. Jordà M, Olmeda D, Vinyals A, et al. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci*. 2005; 118(Pt 15):3371-85.
94. Cannito S, Novo E, Compagnone A, et al. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008; 29(12):2267-78.

95. Peinado H, Quintanilla M, Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem.* 2003; 278(23):21113-23.
96. Yook JI, Li XY, Ota I, et al. A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol.* 2006; 8(12):1398-406.
97. Matysiak M, Kapka-Skrzypczak L, Jodłowska-Jędrych B. et al. EMT promoting transcription factors as prognostic markers in human breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2017; 295:817–825.
98. Heatley MK, Ewings P, Odling Smee W, et al. Vimentin expression does not assist in predicting survival in ductal carcinoma of the breast. *Pathology.* 2002; 34(3):230-2.
99. Côme C, Maginino F, Bibeau F, et al. Snail and Slug play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(18):5395-5402.
100. Jeong H, Ryu YJ, An J, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype. *Histopathology.* 2012; 60(6B):E87-95.
101. Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004; 117(7):927-39.
102. Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, et al. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol.* 2005; 206(4):451-7.
103. Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, et al. Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61(13):5168-78.
104. Raymond WA, Leong AS. Co-expression of cytokeratin and vimentin intermediate filament proteins in benign and neoplastic breast epithelium. *J Pathol.* 1989; 157(4):299-306.
105. Constantinidou A, Jones RL, Reis-Filho JS. Beyond triple-negative breast cancer: the need to define new subtypes. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010; 10(8): 1197-1213.
106. Yamamoto M, Ito T, Shimizu T, et al. Epigenetic alteration of the NF-κB-inducing kinase (NIK) gene is involved in enhanced NIK expression in basal-like breast cancer. *Cancer Sci.* 2010; 101(11):2391-7.
107. Wang X, Belguise K, Kersual N, et al. Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(4):470-8.

108. Loboda A, Nebozhyn MV, Watters JW, et al. EMT is the dominant program in human colon cancer. *BMC Med Genomics*. 2011; 4:9.
109. Whittle MC, Hingorani SR. Disconnect between EMT and metastasis in pancreas cancer. *Oncotarget*. 2015; 6(31):30445-6.
110. Bartis D, Mise N, Mahida RY, et al. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax*. 2014; 69(8):760-5.
111. Wang Z, Ahmad A, Li Y, et al. Emerging roles of PDGF-D signaling pathway in tumor development and progression. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1806(1):122-30.
112. Giannelli G, Koudelkova P, Dituri F, Mikulits W. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2016; 65(4):798-808.
113. Wu Y, Sarkissyan M, Vadgama JV. Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *J Clin Med*. 2016; 5(2):13.

XII. ANEKS

| Nr badania | wiek | typ raka | N ^a | M ^b | śr.guza | grade | angioinwazja |
|------------|------|--------------|----------------|----------------|---------|-------|--------------|
| 31534/13 | >65 | ca.ductale | 0 | 0 | 42 mm | G2 | brak |
| 47790/13 | >65 | ca.ductale | 7 | 0 | 42 mm | G3 | obecna |
| 27369/13 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 7 mm | G1 | brak |
| 23165/13 | <65 | ca.ductale | 5 | 0 | 17 mm | G2 | obecna |
| 38286/13 | >65 | ca.ductale | 7 | 0 | 32 mm | G2 | obecna |
| 50875/13 | >65 | ca.ductale | 5 | 0 | 30 mm | G2 | brak |
| 4785/14 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 10 mm | G2 | brak |
| 4782/14 | <65 | ca.lobulare | 0 | 0 | 11 mm | G2 | brak |
| 45590/14 | >65 | ca.lob+duc | 0 | 0 | 25 mm | G2 | brak |
| 4476/14 | >65 | ca.ductale | 1 | 0 | 38 mm | G2 | obecna |
| 6863/14 | <65 | ca.ductale | 1 | 0 | 14 mm | G2 | brak |
| 14363/15 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 30 mm | G2 | brak |
| 17794/15 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 11 mm | G2 | brak |
| 14364/15 | >65 | ca.ductale | 0 | 0 | 22 mm | G3 | brak |
| 19690/15 | 65 | ca.ductale | 1 | 0 | 40 mm | G2 | brak |
| 4695/15 | <65 | ca.papilare | 0 | 0 | 12 mm | G2 | brak |
| 12320/15 | <65 | ca.ductale | 3 | 0 | 5 mm | G2 | obecna |
| 17640/15 | >65 | ca.ductale | 0 | 0 | 17 mm | G3 | brak |
| 21615/15 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 25 mm | G2 | brak |
| 22607/15 | >65 | ca.lobulare | 0 | 0 | 32 mm | G2 | brak |
| 18815/15 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 8 mm | G2 | brak |
| 23488/15 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 25 mm | G2 | brak |
| 6208/17 | <65 | ca.ductale | 1 | 0 | 16 mm | G1 | brak |
| 7920/17 | >65 | ca.lobulare | 0 | 0 | 22 mm | G1 | brak |
| 17312/17 | <65 | ca.ductale | 8 | 0 | 30 mm | G3 | obecna |
| 4361/17 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 14 mm | G3 | brak |
| 8496/17 | <65 | ca.papilare0 | 0 | 0 | 19 mm | G2 | brak |
| 11115/17 | 65 | ca.lobulare | 0 | 0 | 17 mm | G2 | brak |
| 5548/17 | <65 | ca.lobulare | 10 | 0 | 90 mm | G2 | brak |

| | | | | | | | |
|-----------------|-----|----------------|----|---|--------|----|--------|
| 15579/17 | >65 | ca.ductale | 7 | 0 | 90 mm | G2 | obecna |
| 5079/18 | >65 | ca.ductale | 2 | 0 | 8 mm | G1 | brak |
| 3890/18 | >65 | ca.lobulare | 1 | 0 | 20 mm | G2 | brak |
| 8630/18 | >65 | ca.ductale | 0 | 0 | 17 mm | G2 | obecna |
| 8487/18 | >65 | ca.ductale | 0 | 0 | 12 mm | G2 | brak |
| 7359/18 | >65 | ca.ductale | 0 | 0 | 5 mm | G2 | brak |
| 6610/18 | >65 | ca.medulare | 0 | 0 | 30 mm | G2 | obecna |
| 10355/18 | >65 | ca.lobulare | 0 | 0 | 19 mm | G2 | Brak |
| 10674/17 | <65 | ca.lobulare | 1 | 0 | 31 mm | G1 | brak |
| 11495/17 | >65 | ca.ductale | 0 | 0 | 17 mm | G1 | brak |
| 20798/17 | <65 | ca.ductale | 1 | 0 | 7 mm | G1 | obecna |
| 21170/17 | <65 | ca.ductale | 3 | 0 | 7,5 mm | G2 | brak |
| 22090/17 | <65 | ca.lobulare | 0 | 0 | 14 mm | G2 | obecna |
| 23171/17 | <65 | ca.ductale | 0 | 1 | 18 mm | G1 | brak |
| 24328/17 | >65 | ca.ductale | 1 | 0 | 24 mm | G3 | obecna |
| 24387/17 | >65 | ca.lobulare | 1 | 0 | 30 mm | G2 | brak |
| 25247/17 | >65 | ca.ductale | 0 | 0 | 22 mm | G3 | obecna |
| 7482/17 | <65 | ca.ductale | 4 | 0 | 17 mm | G3 | obecna |
| 25490/17 | 65 | ca.ductale | 1 | 0 | 50 mm | G2 | brak |
| 25883/17 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 10 mm | G2 | brak |
| 10780/18 | >65 | ca.cribriforme | 0 | 0 | 16 mm | G2 | brak |
| 1011/17 | >65 | ca.lobulare | 13 | 0 | 22 mm | G2 | obecna |
| 3756/18 | >65 | ca.ductale | 0 | 0 | 22 mm | G3 | obecna |
| 6379/18 | <65 | ca.lob+duc | 1 | 0 | 35 mm | G2 | obecna |
| 2770/18 | >65 | ca.lobulare | 0 | 0 | 35 mm | G2 | brak |
| 3971/18 | >65 | ca.ductale | 1 | 0 | 13 mm | G1 | obecna |
| 2003/16 | >65 | ca.ductale | 1 | 0 | 25 mm | G1 | brak |
| 23347/18 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 15 mm | G2 | brak |
| 2179/16 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 30 mm | G2 | brak |
| 10584/17 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 12 mm | G2 | brak |
| 22150/16 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 7 mm | G2 | brak |
| 24493/18 | <65 | ca.lobulare | 1 | 0 | 15 mm | G2 | brak |
| 26136/16 | >65 | ca.ductale | 0 | 0 | 24 mm | G3 | brak |

| | | | | | | | |
|-----------------|-----|-------------|---|---|-------|----|--------|
| 24497/16 | >65 | ca.lobulare | 0 | 0 | 7 mm | G2 | brak |
| 23074/16 | >65 | ca.ductale | 1 | 0 | 18 mm | G2 | obecna |
| 6870/18 | <65 | ca.ductale | 0 | 0 | 8 mm | G2 | brak |

^a – stan pachowych węzłów chłonnych

^b – obecność przerzutów odległych

| Nr badania | typ luminalny | E-kad | N-kad | wim | Snail | Slug |
|-------------------|----------------------|--------------|--------------|------------|--------------|-------------|
| 31534/13 | B HER2 minus | 12 | 12 | 8 | 6 | 1 |
| 47790/13 | B HER2 minus | 12 | 12 | 8 | 2 | 2 |
| 27369/13 | B HER2 minus | 12 | 12 | 6 | 6 | 3 |
| 23165/13 | B HER2 plus | 12 | 12 | 8 | 6 | 3 |
| 38286/13 | A | 12 | 12 | 8 | 1 | 3 |
| 50875/13 | B HER2 minus | 12 | 12 | 12 | 6 | 8 |
| 4785/14 | B HER2 minus | 12 | 12 | 3 | 3 | 2 |
| 4782/14 | B HER2 minus | 12 | 12 | 12 | 8 | 1 |
| 45590/14 | B HER2 minus | 9 | 12 | 8 | 3 | 1 |
| 4476/14 | A | 12 | 12 | 3 | 2 | 2 |
| 6863/14 | B HER2 plus | 12 | 12 | 8 | 6 | 2 |
| 14363/15 | A | 12 | 12 | 12 | 3 | 8 |
| 17794/15 | B HER2 minus | 12 | 12 | 2 | 3 | 1 |
| 14364/15 | B HER2 plus | 3 | 12 | 8 | 3 | 6 |
| 19690/15 | B HER2 minus | 3 | 12 | 8 | 6 | 2 |
| 4695/15 | A | 12 | 12 | 8 | 8 | 2 |
| 12320/15 | B HER2 minus | 12 | 12 | 8 | 6 | 8 |
| 17640/15 | B HER2 plus | 12 | 12 | 8 | 3 | 8 |
| 21615/15 | A | 12 | 12 | 8 | 8 | 2 |
| 22607/15 | A | 12 | 12 | 8 | 6 | 8 |
| 18815/15 | A | 12 | 12 | 12 | 6 | 8 |
| 23488/15 | B HER2 plus | 12 | 12 | 8 | 6 | 4 |
| 6208/17 | B HER2 minus | 12 | 12 | 8 | 3 | 3 |
| 7920/17 | A | 0 | 12 | 3 | 8 | 8 |
| 17312/17 | potrój.ujemny | 3 | 12 | 4 | 8 | 8 |
| 4361/17 | potrój.ujemny | 9 | 12 | 4 | 8 | 8 |

| | | | | | | |
|-----------------|---------------|----|----|---|----|----|
| 8496/17 | A | 8 | 12 | 1 | 8 | 6 |
| 11115/17 | A | 6 | 8 | 4 | 1 | 8 |
| 5548/17 | A | 0 | 12 | 2 | 6 | 12 |
| 15579/17 | A | 12 | 12 | 2 | 8 | 8 |
| 5079/18 | B HER2 minus | 12 | 12 | 2 | 4 | 2 |
| 3890/18 | A | 6 | 12 | 3 | 8 | 8 |
| 8630/18 | B HER2 minus | 12 | 8 | 0 | 8 | 3 |
| 8487/18 | B HER2 minus | 12 | 12 | 0 | 6 | 3 |
| 7359/18 | A | 12 | 12 | 3 | 8 | 8 |
| 6610/18 | B HER2 minus | 12 | 12 | 8 | 8 | 6 |
| 10355/18 | B HER2 minus | 0 | 12 | 0 | 8 | 8 |
| 10674/17 | A | 0 | 12 | 3 | 8 | 8 |
| 11495/17 | A | 12 | 12 | 0 | 8 | 2 |
| 20798/17 | B HER plus | 12 | 12 | 3 | 8 | 8 |
| 21170/17 | nie luminalny | 12 | 12 | 4 | 8 | 8 |
| 22090/17 | A | 12 | 12 | 0 | 8 | 8 |
| 23171/17 | B HER2 minus | 12 | 12 | 4 | 8 | 8 |
| 24328/17 | B HER2 minus | 12 | 12 | 3 | 8 | 8 |
| 24387/17 | A | 12 | 12 | 0 | 8 | 6 |
| 25247/17 | A | 12 | 12 | 2 | 6 | 2 |
| 7482/17 | potrój.ujemny | 12 | 12 | 4 | 12 | 8 |
| 25490/17 | A | 12 | 12 | 0 | 8 | 3 |
| 25883/17 | potrój.ujemny | 12 | 12 | 4 | 6 | 8 |
| 10780/18 | A | 12 | 12 | 0 | 8 | 1 |
| 1011/17 | A | 0 | 12 | 3 | 8 | 3 |
| 3756/18 | potrój.ujemny | 12 | 12 | 8 | 8 | 6 |
| 6379/18 | B HER2 minus | 12 | 12 | 3 | 8 | 6 |
| 2770/18 | A | 0 | 12 | 4 | 6 | 8 |
| 3971/18 | A | 12 | 12 | 4 | 6 | 3 |
| 2003/16 | A | 12 | 12 | 3 | 8 | 8 |
| 23347/18 | A | 6 | 12 | 3 | 6 | 8 |
| 2179/16 | B HER2 minus | 12 | 12 | 4 | 6 | 8 |
| 10584/17 | B HER2 minus | 12 | 12 | 3 | 6 | 2 |

| | | | | | | |
|-----------------|---------------|----|----|---|---|----|
| 22150/16 | B HER2 minus | 12 | 12 | 4 | 8 | 12 |
| 24493/18 | A | 0 | 12 | 4 | 6 | 8 |
| 26136/16 | potrój.ujemny | 12 | 12 | 8 | 6 | 8 |
| 24497/16 | B HER2 minus | 6 | 12 | 3 | 6 | 8 |
| 23074/16 | B HER2 minus | 9 | 12 | 4 | 6 | 8 |
| 6870/18 | B HER2 minus | 12 | 12 | 4 | 8 | 8 |

| Nr badania | ER | PR | HER2 | Ki67 | CTH |
|-------------------|-----------|-----------|-------------|-------------|------------|
| 31534/13 | plus | plus | minus | 22 | |
| 47790/13 | plus | plus | minus | 28 | |
| 27369/13 | plus | plus | minus | 26 | |
| 23165/13 | plus | plus | plus | 41 | |
| 38286/13 | plus | plus | plus | 10 | |
| 50875/13 | plus | plus | minus | 25 | |
| 4785/14 | plus | plus | minus | 35 | |
| 4782/14 | plus | plus | minus | 30 | |
| 45590/14 | plus | plus | minus | 25 | |
| 4476/14 | plus | plus | minus | 18 | |
| 6863/14 | minus | plus | plus | 30 | |
| 14363/15 | plus | plus | minus | 13 | |
| 17794/15 | plus | plus | minus | 30 | |
| 14364/15 | plus | plus | plus | 50 | |
| 19690/15 | plus | plus | minus | 40 | |
| 4695/15 | plus | plus | minus | 10 | |
| 12320/15 | plus | plus | minus | 50 | |
| 17640/15 | plus | plus | plus | 48 | |
| 21615/15 | plus | plus | minus | 16 | |
| 22607/15 | plus | plus | minus | 12 | |
| 18815/15 | plus | plus | minus | 8 | |
| 23488/15 | minus | plus | plus | 60 | |
| 6208/17 | plus | plus | minus | 23 | |
| 7920/17 | plus | minus | minus | 5 | |
| 17312/17 | minus | minus | minus | 40 | po CTH |

| | | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|----|--------|
| 4361/17 | minus | minus | minus | 2 | po CTH |
| 8496/17 | minus | plus | minus | 8 | |
| 11115/17 | plus | plus | minus | 1 | |
| 5548/17 | plus | plus | minus | 15 | |
| 15579/17 | plus | minus | minus | 15 | |
| 5079/18 | plus | plus | minus | 22 | |
| 3890/18 | plus | plus | minus | 11 | |
| 8630/18 | plus | plus | minus | 45 | |
| 8487/18 | plus | plus | minus | 52 | |
| 7359/18 | plus | plus | minus | 5 | |
| 6610/18 | plus | minus | minus | 35 | |
| 10355/18 | plus | plus | minus | 25 | |
| 10674/17 | plus | plus | minus | 17 | |
| 11495/17 | plus | plus | plus | 15 | |
| 20798/17 | plus | plus | plus | 23 | |
| 21170/17 | minus | minus | plus | 18 | po CTH |
| 22090/17 | plus | plus | minus | 15 | |
| 23171/17 | plus | plus | minus | 24 | |
| 24328/17 | plus | plus | minus | 50 | |
| 24387/17 | plus | plus | minus | 4 | |
| 25247/17 | minus | plus | minus | 20 | |
| 7482/17 | minus | minus | minus | 62 | po CTH |
| 25490/17 | plus | plus | minus | 20 | po CTH |
| 25883/17 | minus | minus | minus | 70 | po CTH |
| 10780/18 | plus | plus | minus | 10 | |
| 1011/17 | plus | plus | minus | 10 | |
| 3756/18 | minus | minus | minus | 48 | |
| 6379/18 | plus | plus | minus | 30 | |
| 2770/18 | plus | plus | minus | 5 | po CTH |
| 3971/18 | plus | plus | minus | 20 | |
| 2003/16 | plus | plus | minus | 20 | |
| 23347/18 | plus | plus | minus | 1 | |
| 2179/16 | plus | minus | plus | 46 | |

| | | | | | |
|-----------------|-------|-------|-------|----|--|
| 10584/17 | plus | minus | minus | 20 | |
| 22150/16 | plus | plus | minus | 25 | |
| 24493/18 | plus | plus | minus | 5 | |
| 26136/16 | minus | minus | minus | 43 | |
| 24497/16 | plus | plus | minus | 24 | |
| 23074/16 | plus | plus | minus | 44 | |
| 6870/18 | plus | plus | minus | 24 | |