

**Wybrane czynniki prognostyczne i predykcyjne u młodych
kobiet chorych na raka piersi.**

lek. med. Elżbieta Bręborowicz

Klinika Onkologii Katedry Onkologii UM w Poznaniu

Promotor: dr hab. med. Piotr Wysocki

Poznań, 2011

SPIS TREŚCI

1. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY:	3
2. WSTĘP	4
2.1 Czynniki ryzyka raka piersi	4
2.2 Diagnostyka raka piersi	5
2.3 Kliniczny i patomorfologiczny stopień zaawansowania	6
2.4 Cechy raka piersi u młodych kobiet	8
2.5 Klasyczne czynniki prognostyczne	10
2.6 Czynniki predykcyjne	16
3. CEL PRACY	17
4. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ	18
4.1 Materiał kliniczny	18
4.2 Badania histopatologiczne	18
4.3 Badania immunohistochemiczne	20
4.4 Kryteria oceny reakcji immunohistochemicznych	24
4.5 Statystyczna ocena wyników	26
5. WYNIKI	28
5.1 Typy histologiczne raka piersi występujące w analizowanych populacjach chorych	28
5.2 Złośliwość histologiczna, stopień zaawansowania i inne niekorzystne cechy prognostyczne guzów nowotworowych w analizowanych populacjach chorych	28
5.3 Ekspresja receptorów steroidowych i HER2 w komórkach raka piersi	31
5.4. Immunohistochemiczna ocena dynamiki proliferacji komórkowej	33
5.5 Analiza ekspresji białek o dyskusyjnym znaczeniu prognostycznym	34
5.6 Analizy immunohistochemiczne białek determinujących właściwości biologiczne komórek raka piersi	34
5.7 Analizy zależności czasu przeżycia całkowitego w populacji młodych chorych na raka i przeżyć całkowitych od wybranych cech klinicznych, patologicznych i molekularnych	35
6. DYSKUSJA	44
7. WNIOSKI	56
8. STRESZCZENIE	57
9. PIŚMIENNICTWO	62

1. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY:

BRCA1 – ang. Breast Cancer1- gen supresorowy zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 17

BRCA2 –ang. Breast Cancer2- gen supresorowy zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 13

CK5/6 - cytokeratyna 5/6

CK14 - cytokeratyna 14

DCIS - łac. ductal carcinoma in situ – rak przewodowy in situ

E-CD- E- kadheryna

EGFR – ang. Epidermal Growth Factor Receptor - receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu

ER - receptor estrogenowy alfa

ER beta - receptor estrogenowy beta

FISH - ang. fluorescence in situ hybridization - fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

HER2 – ang. Human Epidermal growth factor Receptor 2 - receptor naskórkowego czynnika wzrostu typu 2

IMH- immunohistochemia

Ki67 - marker proliferacji komórkowej

LCIS – łac. lobular carcinoma in situ – rak zrazikowy in situ

p- poziom istotności statystycznej

p53 - onkoproteina, produkt genu *P53*

PgR - receptor progesteronów

VIM -wimentyna

2. WSTĘP

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce. W 2008 roku w naszym kraju zachorowało 14 576 kobiet, a standaryzowany współczynnik zachorowalności wyniósł 49, 1/100 000. Według Krajowego Rejestru Nowotworów w latach 2006-2008 liczba zachorowań stale wzrasta [1].

Ryzyko zachorowania na raka piersi zwiększa się wraz z wiekiem. Najczęściej chorują kobiety w okresie okołomenopauzalnym pomiędzy 50 a 69 rokiem życia. Tylko 2%-5% wszystkich raków piersi rozpoznaje się u kobiet młodych do 35 roku życia [2,3].

Liczba zgonów z powodu tego nowotworu wzrasta po 45 roku życia. W ciągu ostatnich dwóch lat w krajach rozwijających się, w tym i w Polsce obserwuje się ogólne zmniejszenie trendu umieralności z powodu raka piersi, co wynika z ogromnego postępu w rozpoznawaniu i leczeniu tego nowotworu.

2.1 Czynniki ryzyka raka piersi

Zdefiniowano bardzo wiele czynników ryzyka zachorowania na raka piersi, a najważniejsze z nich to: płeć żeńska, starszy wiek, pierwsza miesiączka we wczesnym wieku, późny wiek ostatniej miesiączki, pierwszy poród zakończony żywo urodzonym dzieckiem w starszym wieku, długotrwała hormonalna terapia zastępcza, wcześniejsza ekspozycja na promieniowanie jonizujące, wysoki wskaźnik BMI u młodych kobiet [4], długotrwała antykoncepcja hormonalna [5].

Do czynników genetycznych zalicza się nosicielstwo mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2*, *TP53* - związane z zespołem Li-Fraumeni, *PTEN* oraz *CHEK2*. U 25% chorych z obciążonym wywiadem rodzinnym wykrywa się mutację w genie *BRCA1* lub *BRCA2*. Obecnie na świecie nie prowadzi się powszechnych programów przesiewowych w celu wykrycia mutacji w jednym z wyżej wymienionych genów. Ryzyko zachorowania na raka piersi u nosicieli

mutacji w genie *BRCA1* i *BRCA2* wynosi 60-80% w ciągu całego życia [6]. U młodych kobiet z mutacją *BRCA1* rak piersi charakteryzuje się wysoką złośliwością histologiczną oraz fenotypem potrójnie ujemnym, co wiąże się ze zdecydowanie gorszym rokowaniem [7]. Nosicielkom mutacji proponuje się regularne wykonywanie badań obrazowych piersi przy użyciu rezonansu magnetycznego, mammografii i USG oraz częste badania ginekologiczne w związku z wyraźnie podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka jajnika. W wielu przypadkach zaleca się również profilaktyczne usunięcie jajników i ewentualnie miększu piersi, jednak postępowanie to jest często trudne do zaakceptowania przez kobiety, u których wykryto mutację w jednym z wyżej wymienionych genów wysokiej penetracji.

2.2 Diagnostyka raka piersi

Najlepszym badaniem wykrywającym raka piersi jest mammografia, którą stosuje się samodzielnie lub z uzupełniającym badaniem ultrasonograficznym. Stanowi ona, wedle zaleceń Amerykańskiego Towarzystwa Radiologów podstawowe narzędzie do badań przesiewowych w kierunku raka piersi u kobiet po 40 roku życia (w Polsce Ministerstwo Zdrowia finansuje mammograficzne badania przesiewowe u kobiet w wieku od 50-69 roku życia). U kobiet młodszych (do 40 roku życia) nie wykonuje się przesiewowej mammografii ze względu na gęstą strukturę tkanki piersi, która uniemożliwia prawidłową interpretację wyniku badania [8]. W tej grupie wiekowej czułym i dość swoistym badaniem jest ultrasonografia [9]. Aktualnie najczulszym badaniem obrazowym w diagnostyce raka piersi w każdej grupie wiekowej jest rezonans magnetyczny. W diagnostyce raka piersi wciąż duże znaczenie ma badanie fizykalne, bowiem pozwala ono na wykrycie około 37% guzów złośliwych [10]. Każda nieprawidłowa masa stwierdzana w badaniu palpacyjnym czy obrazowym powinna zostać zweryfikowana w badaniu biopsyjnym (biopsja aspiracyjna cienkoigłowa, gruboigłowa, wycinająca, śródoperacyjna) [11].

Podstawowym leczeniem raka piersi jest operacyjne usunięcie chorych tkanek.

Postępowaniem standardowym u chorych bez klinicznych cech obecności przerzutów uznaje się aktualnie biopsję węzła wartowniczego [12].

2.3 Kliniczny i patomorfologiczny stopień zaawansowania

Kliniczny stopień zaawansowania raka piersi przedstawia się według klasyfikacji TNM, opartej na kryteriach anatomicznych, gdzie T oznacza wielkość guza, N stan regionalnych węzłów chłonnych, a M obecność przerzutów odległych [13]. Klasyfikacja ta umożliwia określenie grup chorych, u których można przeprowadzić pierwotne, radykalne leczenie operacyjne, lub które wymagają pierwotnego leczenia systemowego.

Określenie „rak piersi” odnosi się do heterogennej grupy guzów w obrębie gruczołu piersiowego w większości wywodzących się z nabłonka przewodów mlekowych i/lub zrazików. Możemy je podzielić na dwie podstawowe kategorie: raki przedinwazyjne (przewodowe lub zrazikowe) i naciekające (inwazyjne) [14].

W dobie coraz bardziej rozpowszechnionych przesiewowych badań mammograficznych przedinwazyjny rak przewodowy (DCIS) jest rozpoznawany coraz częściej. Decyzje terapeutyczne w przypadku zdiagnozowania DCIS podejmuje się w oparciu o indeks Van Nys, w którym analizuje się 4 cechy tj.: wiek chorej, typ histologiczny, szerokość marginesu operacyjnego oraz średnicę guza. W zależności od sumy uzyskanych punktów wybiera się leczenie oszczędzające z następową radioterapią lub mastektomię.

DCIS jest częstym komponentem raka naciekającego przewodowego.

Rak zrazikowy przedinwazyjny (LCIS) jest wykrywany przypadkowo, a jego obecność zwiększa ryzyko wystąpienia raka naciekającego w obu piersiach. Nie wymaga leczenia operacyjnego ani uzupełniającego [15].

Światowa Organizacja Zdrowia wyróżnia 19 histologicznych typów raka naciekającego. Najczęstszym, występującym u około 80% chorych jest rak przewodowy [16]. Rak zrazikowy naciekający rozpoznawany jest w prawie 20%, a pozostałe typy takie jak np. rdzeniasty, cewkowy, śluzowy są rozpoznawane rzadko i wiążą się z bardzo dobrym rokowaniem.

Złośliwość histologiczną (cecha G) określa się na podstawie klasyfikacji Blooma i Richardsona w modyfikacji Elstona i Ellisa [17]. Klasyfikacja ta oparta jest na ocenie zdolności tworzenia cewek, polimorfizmu komórkowego i liczby mitoz. Każdej z tych cech w zależności od stopnia nasilenia przypisywane są punkty, których suma pozwala określić trzy różne stopnie złośliwości raka piersi. Wyróżniamy niski - G1, pośredni - G2 i wysoki - G3 stopnie złośliwości histologicznej.

Ocena histopatologiczna materiału operacyjnego pozwala na ustalenie rzeczywistych rozmiarów guza (pT), oraz ilości węzłów chłonnych zajętych przez proces nowotworowy (pN). Standardem w diagnostyce histologicznej raka piersi jest także ocena obecności receptorów estrogenowych (ER), progesteronowych (PgR) oraz receptorów ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2) przy pomocy technik immunohistochemicznych. Ocena histologiczna guza nowotworowego pozwala na ustalenie optymalnego sposobu dalszego postępowania terapeutycznego.

Próbując wyodrębnić grupę kobiet, które odniosą największe korzyści z leczenia uzupełniającego stosuje się (na razie głównie w ramach badań klinicznych) analizę ekspresji szeregu genów w oparciu o techniki mikromacierzy RNA. Molekularne testy diagnostyczne takie jak MammaPrint czy OncotypeDX oparte są o mikromacierze analizujące odpowiednio 70 lub 21 genów związanych z wysokim ryzykiem nawrotu raka piersi umożliwiając zidentyfikowanie chorych, które muszą zostać poddane chemioterapii uzupełniającej.

Dzięki analizie profilu genetycznego w oparciu o techniki mikromacierzy możemy również wyodrębnić podtypy raka piersi takie jak:

1. luminalny A i B
2. z ekspresją receptora HER2
3. naśladujący nabłonek prawidłowego gruczołu piersiowego
4. z komórek typu podstawnego (basal-like) [18].

Najlepsze rokowanie stwierdza się u chorych, u których stwierdzono podtypy raka piersi z ekspresją receptora ER (luminalny A i B), natomiast aktualnie najgorsze rokowanie mają chore z podtypem podstawnym. Jak dotąd rutynowo nie charakteryzuje się podtypów molekularnych raków piersi w praktyce klinicznej, choć dopuszcza się, aby wyniki zwalidowanych testów wielogenowych były brane pod uwagę podczas podejmowania decyzji terapeutycznych [14]. Obecnie w standardowym badaniu histologicznym metodami immunohistochemicznymi ocenia się obecność szeregu białek, które można skorelować z różnymi podtypami molekularnymi raka piersi. Zauważono, że komórki typu podstawnego (basal-like) bardzo często mają fenotyp potrójnie ujemny (brak ekspresji receptorów ER, PgR i HER2), natomiast stwierdza się w nich obecność EGFR, cytokeratyny (CK) 5/6 i/lub cytokeratyny (CK)14 [19,20]. Zagadnienie to jest niezmiernie istotne w kontekście raka piersi dotyczącego młodych kobiet, u których w ok. 37% wykrywa się fenotyp potrójnie ujemny [21].

2.4 Cechy raka piersi u młodych kobiet

Winchester i wsp. zdefiniowali następujące grupy wiekowe kobiet chorych na raka piersi:

- a) kobiety młode - wszystkie chore przed menopauzą w wieku do 35 roku życia,
- b) starsze kobiety przed menopauzą,
- c) starsze kobiety po menopauzie [22].

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem występującym u kobiet przed 35 rokiem życia.

W tej grupie chorych 80% guzów wykrywanych jest przy pomocy badania palpacyjnego,

a średni wymiar guza to 2cm [21]. U młodych kobiet, nosicielek mutacji genów wysokiego ryzyka raka piersi, na wczesnym etapie rozwoju procesu nowotworowego rezonans magnetyczny pozwala na wykrycie 80% guzów złośliwych, natomiast badanie mammograficzne jest mniej czułe i wykrywa nowotwór tylko w 33% przypadków [10,23]. Tkanka gruczołowa u młodych kobiet zajmuje zazwyczaj powyżej 75% objętości piersi, co utrudnia diagnostykę przy pomocy „złotego standardu” jakim jest mammografia.

Wykryte w badaniach obrazowych zmiany w piersi poddaje się biopsji cienkoigłowej, której czułość sięga 78%. Klasycznym „testem potrójnej diagnozy”, czyli badaniem palpacyjnym, badaniem radiologicznym oraz biopsją aspiracyjną cienkoigłową można potwierdzić 95% rozpoznań [24]. U 33% chorych na raka piersi w wieku 20-29 lat stwierdza się mutacje genów *BRCA1*, *BRCA2*, przy czym nosicielki tych mutacji w ogólnej populacji chorych stanowią tylko 5-10% [25]. Biologia raka piersi u kobiet przed 35 rokiem życia jest specyficzna, guzy charakteryzują się niskim zróżnicowaniem komórkowym, czyli wysoką złośliwością histologiczną (G3). Częściej spotyka się inwazję naczyń chłonnych i krwionośnych przez komórki nowotworowe oraz przerzuty do węzłów chłonnych pachowych. U młodych chorych, zdecydowanie częściej niż w ogólnej populacji nie wykrywa się obecności receptorów estrogenowych i progesteronowych, natomiast znacznie częściej stwierdza się wysoką ekspresję markera proliferacyjnego Ki 67 oraz białka p53. Wydaje się, że również częściej stwierdza się nadekspresję genu HER2, jednak nie jest to do końca ustalone. W badaniach Marou i wsp 44% raków piersi u młodych kobiet wykazywało nadekspresję HER2 podczas gdy w badaniach Choi i wsp odsetek ten wynosił 28% [26,27].

U młodych chorych występuje częściej tzw. fenotyp potrójnie ujemny, który często koreluje z występowaniem typu podstawnego(basal-like) raka piersi, charakteryzującego się gorszym rokowaniem.

Wszystkie wyżej wymienione cechy sprawiają, że młode chore z rakiem piersi charakteryzują się generalnie krótszym czasem przeżycia wolnego od progresji oraz przeżycia całkowitego w porównaniu ze starszymi grupami wiekowymi.

2.5 Klasyczne czynniki prognostyczne

Od wielu lat dąży się do personalizacji leczenia systemowego chorych z rakiem piersi.

Zastosowanie odpowiedniego, najbardziej optymalnego leczenia u danej chorej, które byłoby obarczone jak najmniejszą toksycznością wymaga zakwalifikowania danej pacjentki do odpowiedniej grupy rokowniczej - o niskim, pośrednim lub wysokim ryzyku rozsiewu/wznowy raka piersi. W tym celu wyodrębniono czynniki, które pomagają prognozować przebieg choroby.

Do czynników prognostycznych zaliczamy:

- wiek
- wielkość guza pierwotnego
- histologiczny stopień złośliwości
- typ histologiczny,
- ilość zajętych przerzutami węzłów chłonnych pachowych
- naciekanie przez guz naczyń chłonnych i krwionośnych
- ekspresja receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PgR)
- stopień ekspresji receptora HER2 [28,29]

Wiek chorych

Zachorowanie na raka piersi u kobiety przed 35 rokiem życia wiąże się z występowaniem guza o wyższej złośliwości, częstszą obecnością przerzutów do pachowych węzłów

chłonnych oraz brakiem ekspresji receptorów estrogenowych. W związku z tym międzynarodowi eksperci na konferencji w St. Gallen w 2005 roku uznali wiek chorych za niezależny, niekorzystny czynnik prognostyczny i zalecili uzupełniające leczenie systemowe u wszystkich młodych chorych [29]. W tej grupie pacjentek stosuje się także uzupełniającą radioterapię w przypadku przerzutów do mniej niż 4 węzłów chłonnych [14].

Sama granica wieku w dobie indywidualizacji leczenia nie jest jednak wystarczającym parametrem do określenia grupy docelowej, która może odnieść największe korzyści z leczenia uzupełniającego. Poszukuje się więc nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych, które można wyodrębnić łatwo dostępnymi technikami diagnostycznymi.

Wielkość guza pierwotnego

U chorych bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych wielkość guza pierwotnego jest użytecznym wskaźnikiem prognostycznym. Chore z guzem poniżej 1cm mają dobre rokowanie, a prawdopodobieństwo 5-cio letniego przeżycia bez wznowy i rozsiewu choroby wynosi u nich powyżej 80% [30]. Ryzyko nawrotu rośnie proporcjonalnie do wielkości guza i dla guzów o średnicy 3-6 cm wynosi 36-38%, a dla guzów o średnicy > 6 cm - 47% [31]. Istnieją doniesienia o chorych z bardzo dużymi (ekstremalnej wielkości) guzami, u których stwierdzono dobre rokowanie. Prawdopodobnie występowanie dużego guza bez zajęcia węzłów chłonnych świadczy o niskim potencjale komórek rakowych do przerzutowania.

Histologiczny stopień złośliwości

Wysoki stopień złośliwości histologicznej G3 koreluje ze skróconym czasem przeżycia całkowitego. Stwierdzany jest on częściej u kobiet młodych i determinuje złe rokowanie w tej grupie chorych. Nisko zróżnicowane nowotwory mimo złego rokowania, z uwagi na wysoką

dynamikę proliferacji są jednak bardziej chemiowrażliwe, i lepiej reagują na leczenie cytostatykami.

Stan okolicznych węzłów chłonnych

Jednym z najważniejszych czynników pozwalających prognozować przebieg choroby jest obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachy po stronie guza.

Przerzuty do innych niż unilateralne, pachowe węzły chłonne określa się jako odległe (M1).

Badanie histopatologiczne dostarcza informacji na temat obecności przerzutów i ilości usuniętych podczas zabiegu operacyjnego węzłów chłonnych. Jest ono niezmiernie istotne także w przypadku operacji oszczędzających, gdzie do badania pobiera się od 1-5 węzłów chłonnych wartowniczych, wcześniej znakowanych radiofarmaceutykami i błękitem metylenowym. W przypadku stwierdzenia przerzutów do węzłów wartowniczych należy wykonać limfadenektomię pachową. U chorych z zajęciem 3 i więcej węzłami chłonnymi prawdopodobieństwo dziesięcioletniego przeżycia wolnego od choroby wynosi 30%, a u chorych bez zajęcia węzłów pachy 70-80%. Obecnie wskazaniem do uzupełniającej radioterapii są przerzuty w czterech i więcej węzłach chłonnych [14]. Niezmiernie istotną informacją kliniczną jest także ilość usuniętych podczas operacji węzłów chłonnych. Aby uznać zabieg za radykalny i prawidłowo wykonany, należy usunąć co najmniej 10 węzłów chłonnych pachy.

Inwazja naczyń krwionośnych i chłonnych

Obecność rozległego okołoguzowego naciekania naczyń chłonnych występuje u około 34% chorych, a naciekanie naczyń krwionośnych u 4%.

Ekspresja receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PgR)

Za pomocą metod immunohistochemicznych oznacza się obecność receptorów hormonalnych w jądrach komórek nowotworowych. Wyniki przedstawia się w skali Allreda jako odsetek wybarwionych jąder oraz siłę ich wybarwienia. Obecnie uważa się, że każda wykrywalna ekspresja receptora estrogenowego świadczy o istnieniu hormonowrażliwości komórek raka piersi i jest wystarczająca dla włączenia terapii hormonalnej [14].

Pierwsze publikacje na temat znaczącej roli receptorów ER ukazały się już w 1977 roku, gdy po raz pierwszy zauważono, że pacjentki z ekspresją receptorów estrogenowych mają gorsze rokowanie [32]. W kolejnych badaniach stwierdzono, że problem ten dotyczył 60% wszystkich chorych na raka piersi [33]. W wyniku zastosowania terapii hormonalnej w leczeniu uzupełniającym uzyskano poprawę wyników leczenia. Obecnie chore na raka piersi wykazującego ekspresję receptorów ER mają lepsze rokowanie [34].

W ogólnej populacji chorych na raka piersi samodzielną hormonoterapię w leczeniu uzupełniającym można zalecić u chorych z małymi guzami (poniżej 2 cm), w pierwszym stopniu złośliwości histologicznej, bez przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, u których występuje wysoka hormonowrażliwość (dodatni wynik barwienia w 50% i więcej jąder komórkowych). Wszystkie pacjentki z guzami pT1a, pN0, ER(+) powinny otrzymać jedynie terapię hormonalną. Leczenie przedoperacyjne oparte o hormonoterapię można zaproponować chorym po menopauzie z wysoką ekspresją receptorów steroidowych. Stwierdzenie obecności receptora progesteronowego przy braku ekspresji receptora estrogenowego jest obecnie uznawane za błąd w ocenie, a ekspresja receptora PgR ma jedynie znaczenie rokownicze, ale nie predykcyjne [14].

Ekspresja receptora HER2

Obecność receptora typu 2 dla ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu ocenia się w błonach komórek nowotworowych przy pomocy barwień immunohistochemicznych stosując przeciwciała wykrywające zewnątrzkomórkową domenę receptora. Wynik analizy HER2 przedstawia się w czterostopniowej skali (0,1+,2+,3+), gdzie 0 oznacza brak obecności zewnątrzkomórkowej domeny receptora, a 3+ wykazuje jej nadekspresję. W guzach, w których uzyskano wynik wątpliwy (2+) ocenia się amplifikację genu *HER2* metodą FISH (fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ). W 20% guzów z poziomem ekspresji HER2 (+2) stwierdza się amplifikację genu *HER2* (stosunek liczby kopii genu *HER2* do liczby centromerów chromosomu 17 $\geq 2,2$). Stwierdzenie nadekspresji HER2 (+3) lub amplifikacji genu *HER2* stanowi czynnik predykcyjny odpowiedzi na leczenie uzupełniające trastuzumabem (przeciwciało monoklonalne anti-HER2) i stanowi warunek rozpoczęcia terapii tym lekiem. Wprowadzenie trastuzumabu do leczenia uzupełniającego u chorych na raka piersi z nadekspresją HER2, umożliwiło znamienne wydłużenie czasu przeżycia całkowitego i redukcję ryzyka zgonu w tej populacji [35].

Inne czynniki prognostyczne

Do innych czynników prognostycznych w raku piersi zaliczamy markery proliferacji komórkowej, między innymi antygen Ki-67, którego ekspresja stwierdzana jest we wszystkich fazach aktywnych cyklu komórkowego. Maksymalny poziom Ki-67 można wykryć podczas mitozy [36]. Wskaźnik antygeny Ki-67 przedstawia się jako odsetek procentowy wyznakowanych jąder komórkowych (niski $\leq 15\%$, średni 16-30%, wysoki $>30\%$). Stwierdzono, że im wyższy stopień złośliwości histologicznej, tym wyższa ekspresja Ki-67. Natomiast niski poziom tego antygeny wiąże się z wysoką ekspresją receptorów steroidowych [37,38]. Zależności pomiędzy Ki-67 a HER2 nie zostały do końca ustalone, bowiem w licznych badaniach na ten temat uzyskano sprzeczne wyniki, co wiązało się

najprawdopodobniej z niewielką liczebnością badanych grup [39]. Wiesner i wsp w grupie 1200 chorych wykazali statystyczne zależności między niskim poziomem Ki-67, niskim stopniem złośliwości histologicznej i brakiem ekspresji receptorów HER2 a przeżyciem. W tym badaniu odsetek przeżyć 10-letnich u chorych, u których stwierdzono wyżej wymienione parametry wynosił 80% [36]. Obecnie Ki-67 jest uznanym czynnikiem prognostycznym i jego wysoki poziom koreluje z wysokim ryzykiem nawrotu raka piersi. Geny regulujące cykl komórkowy i apoptozę to m.in. geny *TP53* i *Bcl-2*. Gen *TP53* jest pierwszym zidentyfikowanym genem supresorowym. Mutacja i unieczynnienie tego genu wiążą się z bardziej agresywnym przebiegiem choroby i gorszym rokowaniem [39,40]. Z kolei nadekspresja genu kodującego białko antyapoptotyczne bcl-2, wiąże się z lepszym rokowaniem u chorych z wczesnym rakiem piersi [41].

E-kadheryna, obecna w komórkach nabłonkowych, jest transbłonowym białkiem odpowiedzialnym za przyleganie komórkowe (adhezję). Łączy ona cytoszkielet komórkowy poprzez kateniny i jej aktywność regulowana jest przez jony wapnia. Obniżona ekspresja tego białka zazwyczaj koreluje z wyższym zaawansowaniem choroby i wyższym ryzykiem progresji [42]. Rola E-kadheryny u chorych z rakiem piersi nie została do końca ustalona. W swoich badaniach Mauro i wsp. oceniali korelację pomiędzy E-kadheryną, ER alfa, EGFR, i uznali, że może ona stać się użytecznym czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na tamoksyfen [43].

Od czasu wytypowania za pomocą techniki mikromacierzy, źle rokujących profili molekularnych, korelujących z fenotypem histologicznym, trwają poszukiwania tanich i szybkich metod ich identyfikacji. Najbardziej dostępne jest badanie immunohistochemiczne, w którym można ocenić obecność specyficznych białek wchodzących w skład komórki nowotworowej. Jak już wyżej wspomniano nadekspresja lub brak ekspresji pewnych określonych białek stanowi użyteczny wskaźnik prognostyczny. Przykładowo, dla potrójnie

ujemnego raka piersi o typie podstawnym takimi markerami są między innymi cytokeratyny 5/6 i 14 oraz receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR).

Cytokeratyny są komponentami cytoszkieletu w prawie wszystkich komórkach nabłonkowych, natomiast EGFR należy do rodziny przezłonowych receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej. Dotychczas ich nadekspresję kojarzono z bardziej agresywnym przebiegiem raka piersi i złym rokowaniem. Obecnie stały się one uznanymi markerami pozwalającymi prognozować przebieg choroby w potrójnie ujemnych rakach piersi [44].

2.6 Czynniki predykcyjne

Czynniki predykcyjne określają prawdopodobieństwo odpowiedzi na leczenie. Do uznanych zaliczamy wcześniej omówione receptory estrogenowe alfa i receptory HER2. Przed erą hormoterapii czy terapii ukierunkowanych molekularnie, chore z wysoką ekspresją tych receptorów miały gorsze rokowanie. Wprowadzenie w pod koniec lat '80 selektywnego modulatora receptora estrogenowego - tamoksyfenu zmniejszyło ryzyko nawrotu o 50%, a zgonu z powodu raka o 35% [45]. Natomiast transtuzumab w skojarzeniu z chemioterapią zastosowany w leczeniu uzupełniającym chorych na raka piersi z nadekspresją receptora HER2 obniża względne ryzyko nawrotu o 50%, a zgonu o 30% [35].

Do nowych, opisywanych w piśmiennictwie czynników predykcyjnych można zaliczyć receptory estrogenowe beta ($ER\beta$), których obecność u chorych $ER\alpha$ pozytywnych jest związane z lepszą odpowiedzią na uzupełniające leczenie tamoksyfenem [46].

W dobie indywidualizacji leczenia oraz dążenia do ograniczania skutków ubocznych terapii systemowych próbuje się identyfikować nowe czynniki prognostyczne i predykcyjne, które umożliwią zdefiniowanie populacji pacjentek wymagających agresywnego leczenia oraz chorych, u których takie leczenie nie będzie konieczne.

3. CEL PRACY

Cel główny

Ocena klasycznych i poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w populacji młodych kobiet chorych na raka piersi.

Cele szczegółowe

1. porównanie występowania klinicznych czynników prognostycznych między populacjami młodych i starszych chorych na raka piersi
2. porównanie występowania patologicznych czynników prognostycznych między populacjami młodych i starszych chorych na raka piersi
3. porównanie występowania molekularnych czynników prognostycznych między populacjami młodych i starszych chorych na raka piersi
4. analiza czasu przeżycia całkowitego młodych chorych na raka piersi z uwzględnieniem zdefiniowanych czynników prognostycznych

4. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

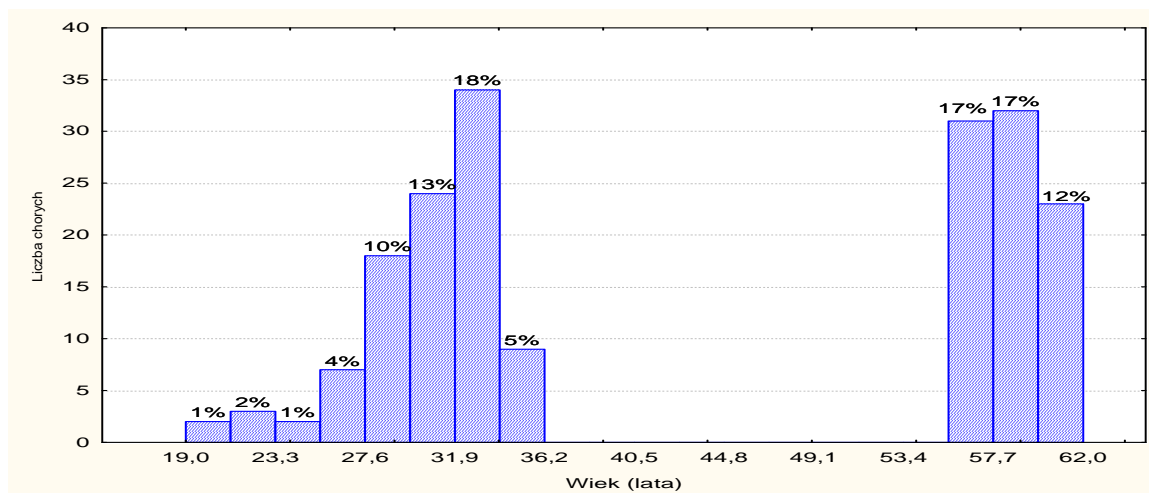
4.1 Materiał kliniczny

Badaniu poddano tkanki pochodzące z 185 kobiet leczonych w Wielkopolskim Centrum Onkologii z powodu wczesnego raka piersi.

Grupę badaną stanowiło 99 chorych w wieku 19-35 (średnia wieku 30 lat) operowanych w latach 2002-2006.

Grupę kontrolną stanowiło 86 chorych w wieku 56-62 (średnia wieku 58 lat), u których w chwili rozpoznania stwierdzono menopauzę i które były operowane w 2006 roku (ryc.1)

Analizie poddano dane kliniczne zawarte w historii chorób oddziałów chirurgii oraz chemioterapii Wielkopolskiego Centrum Onkologii, takie jak: wielkość guza pierwotnego, liczba pobranych podczas zabiegu operacyjnego węzłów chłonnych.



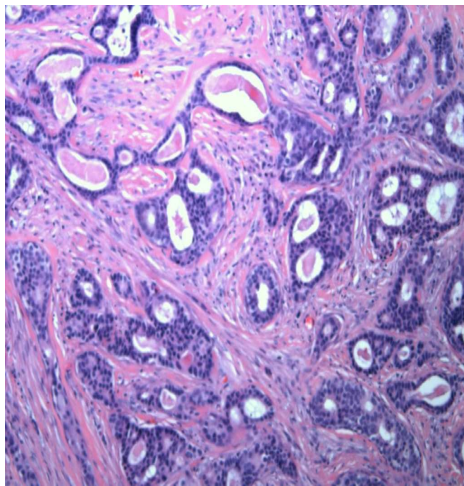
Rycina 1. Histogram wieku chorych poddanych analizie

4.2 Badania histopatologiczne

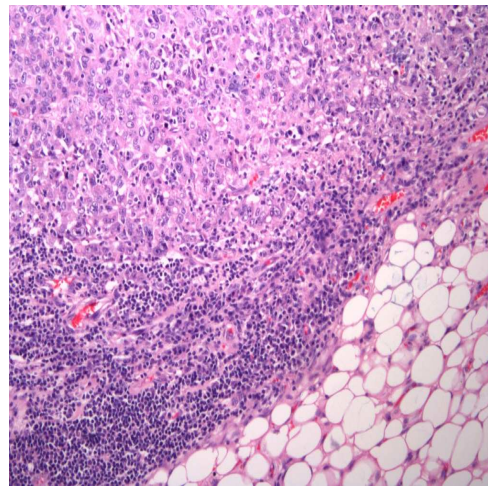
Analizie poddano również parametry zawarte w wynikach badań histologicznych takie jak:

typ histologiczny, stopień złośliwości histologicznej, wielkość guza, ilość węzłów chłonnych

z przerzutem nowotworowym, nacieczenie skóry, brodawki sutkowej oraz torebki węzłów chłonnych przez proces nowotworowy, inwazję naczyń krwionośnych komórkami nowotworowymi. Wszystkie badania mikroskopowe zostały przeprowadzone w Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii. Stopień złośliwości histologicznej został określony w klasyfikacji Blooma i Richardsona w modyfikacji Elstona i Ellisa, która ocenia zdolność tworzenia cewek, polimorfizm komórkowy i liczbę mitoz [17]. Wyniki zostały zapisane w skali 1-3, a suma punktów stanowi podstawę do oceny stopnia złośliwości histologicznej G1- G3 (rys 2).



H+E NHG1



H+E NHG3

Rycina 2. Reakcja barwna obrazująca stopień złośliwości histologicznej- powiększenie 400x

Materiał tkankowy utrwalono w 10% formalinie i umieszczono w procesorze, następnie tkankę zatopiono w parafinie w temperaturze 58°C wg klasycznych metod histologicznych. Z bloczków parafinowych skrojono skrawki o grubości 4-5 μm , następnie nałożono na szkiełka adhezyjne. Skrawki inkubowano w cieplarni przez 2 godziny w temperaturze 58°C.

4.3 Badania immunohistochemiczne

Badania immunohistochemiczne wykonano w Pracowni Immunologii zakładu Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii. Do badań zastosowano następujące odczynniki i immunoreagenty:

I Odczynniki:

1. TBS-sól fizjologiczna buforowana za pomocą Tris/HCL o pH 7,6 (Tris-Buffered Saline firmy DAKO; Code: S1968)

Przygotowanie: substancję przygotowaną przez firmę rozpuszczono w wodzie destylowanej do objętości 5 litrów.

1. Bufor EDTA o pH 8,0; (Target Retrieval Solution 10x Concentrate; firmy DAKO; Code S2367).

2. Bufor Epitope Retrieval Solution 10x Concentrate o pH 6,0 (firmy DAKO; Code: K5204).

3. DAB (3'3- diaminobenzzydina firmy DAKO; Code K 3466).

Roztwór DAB-u przygotowano bezpośrednio przed użyciem.

4. 1% roztwór albuminy, otrzymany przez rozpuszczenie w buforze TBS.

5. Hematoksylina Mayer'a

6. Pertex Mounting Medium firmy HistoLab; Nr 00811. Medium do zatapiania szkiełek nakrywkowych

II Immunoreagenty

1. Monoklonalne przeciwciało mysie przeciw E-cadherin;

Klon NCH-38; Nr katalogowy: M 3612 DAKO.

2. Monoklonalne przeciwciało mysie przeciw BCL-2;

Klon 124; Nr katalogowy: M 0887 DAKO.

3. Monoklonalne przeciwciało mysie przeciw Cytoketatin 5/6;

- Klon D 5/16 B4; Nr katalogowy M 7237 DAKO.
4. Monoklonalne przeciwciało mysie przeciw Estrogen Receptor α ;
Klon SP1; Nr katalogowy: M 3634 DAKO.
 5. Monoklonalne p/c mysie przeciw Ki-67;
Klon MIB-1; Nr katalogowy: M7240 DAKO
 6. Monoklonalne p/c mysie przeciw Vimentin;
Klon V9; Nr katalogowy: M 0725 DAKO
 7. Monoklonalne p/c mysie przeciw Progesterone Receptor;
Klon PGR 636; Nr katalogowy: M 3569 DAKO
 8. Monoklonalne p/c mysie przeciw p53 Protein;
Klon DO-7; Nr katalogowy: M 7001 DAKO
 9. Monoklonalne p/c mysie przeciw Epiderma Growth Factor Receptor; Klon EGFR,
113; Nr katalogowy: NCL-EGFR NOVOCASTRA
 10. Monoklonalne p/c mysie przeciw Cytokeratin 14; Klon LL002;
Nr katalogowy: NCL-L-LL002 NOVOCASTRA
 11. Poliklonalne p/c królicze przeciw Estrogen Receptor beta;
Nr katalogowy: AB1410 CHEMICON
 12. Monoklonalne p/c mysie przeciw BRCA1; Klon MS110;
Nr katalogowy: OP92 CALBIOCHEM
 15. DAKO En-Vision/HRP Anti-Rabbit; Nr katalogowy: K4003
 16. DAKO En-Vision/HRP Anti-Mouse; Nr katalogowy: K4001
 17. HercepTest, Nr katalogowy K 5204, DAKO

Zastosowano metody immunoperoxydazowe dwustopniowe z kompleksem EnVision/HRP.

I Metoda z zastosowaniem kompleksu DAKO En Vision/HRP do wykrywania antygenów:
BCL-2, p-53, BRCA 1, CK 5/6, EGFR.

1. Skrawki materiału histologicznego odparafinowano w ksylenie, przeprowadzono przez szereg alkoholi i płukano w wodzie destylowanej.
2. Preparaty inkubowano w buforze EDTA (pH 8,0) w kuchence mikrofalowej o mocy 250W przez 30 min. Następnie pozostawiono je w tym buforze przez kolejne 20 min.
3. Płukano preparaty w buforze TBS przez 10 min.
4. Aktywność endogennej peroksydazy blokowano w 3% wodnym roztworze nadtlenu wodoru przez 10 min.
5. Preparaty płukano w bieżącej wodzie przez 10 min, następnie w buforze TBS przez 5 min.
6. Inkubowano preparaty przez 60 min ze swoistym przeciwciałem mysim rozcieńczonym w 1% roztworze albuminy TBS:
 - - anty-BCL-2; 1/50
 - - anty- p53; 1/100
 - - anty-BRCA1; 1/150
 - - anty- CK 5/6; 1/50
 - - anty-EGFR; 1/50
7. Płukano preparaty w buforze TBS przez 10 min.
8. Skrawki inkubowano przez 30 min z kompleksem En-Vision/HRP dla przeciwciał monoklonalnych Anti- MOUSE
9. Płukano preparaty w buforze TBS przez 10 min
10. Inkubowano skrawki z DAB-em przez 2 min.
11. Płukano preparaty w buforze TBS i pozostawiono w wodzie destylowanej.

12. Delikatnie podbarwiono jądra komórkowe hematoksyliną Mayer'a i pozostawiono w wodzie aż do zniebieszczenia

13. Przeprowadzono preparaty przez szereg alkoholi, odwodniono w ksylenie i zatopiono w medium - Pertex Mounting Medium.

II. Metoda z zastosowaniem kompleksu DAKO En Vision do wykrywania antygenów: Ki-67, ER- α , PgR, E-CD, VIM, ER-beta i CK 14.

- Odparafinowano skrawki w ksylenie, przeprowadzono przez szereg alkoholi, płukano w wodzie destylowanej.
- Inkubowano preparaty zanurzone w buforze DAKO Target Retrieval Solution x 10 (S1699) na łaźni wodnej (95-99°C) przez 20-40min. Preparaty pozostawiono w tym buforze na 20min.
- Płukano preparaty w buforze TBS przez 10 min
- Aktywność endogennej peroksydazy blokowano w 3% roztworze wodnym nadtlenu wodoru przez 10 min.
- Preparaty płukano w wodzie bieżącej przez 10 min. następnie w buforze TBS przez 5 min.
- Inkubowano skrawki przez 60 min., ze swoistymi przeciwciałem mysim rozcieńczonym w 1% roztworze albuminy w TBS
- anty-ER- α ; 1/50
- anty-PgR; 1/100
- anty-Ki67; 1/300
- anty-E-CD; 1/100
- anty-VIM; 1/200
- anty-CK 14; 1/100

- ze swoistym przeciwciałem króliczym

- anty-ER-beta;1/300

7. Płukano preparaty w buforze TBS przez 10 min.

8. Przez 30 min. inkubowano skrawki z kompleksem En-Vision/HRP

- - dla przeciwciał monoklonalnych Anti- MOUSE
- - dla przeciwciał poliklonalnych Anti- RABBIT

9. Preparaty płukano w buforze TBS przez 10 min.

10. Inkubowano skrawki z DAB-em przez 2 min.

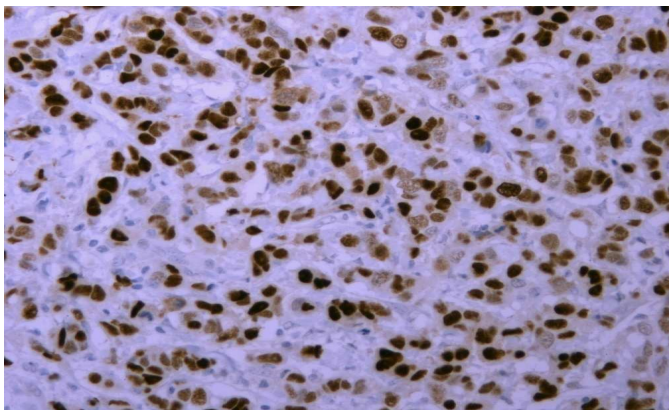
11. Płukano preparaty w buforze TBS i pozostawiono w wodzie destylowanej.

12. Delikatnie podbarwiono jądra komórkowe hematoksyliną Mayer'a i pozostawiono w wodzie aż do zniebieszczenia.

13. Przeprowadzono preparaty przez szereg alkoholi, odwodniono w ksylenie i zatopiono w medium Pertex Mounting Medium.

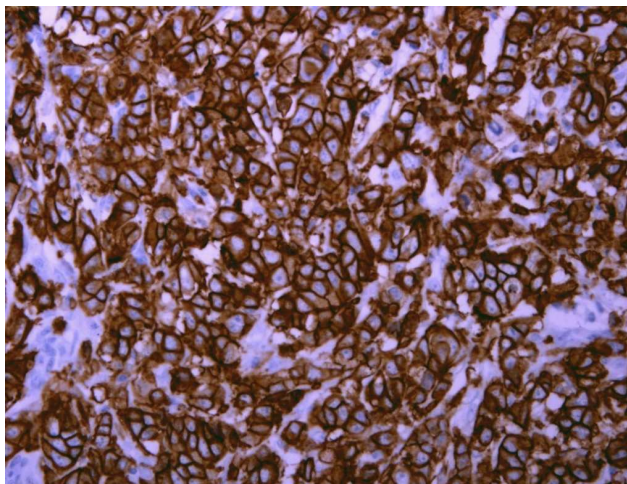
4.4 Kryteria oceny reakcji immunohistochemicznych

Ekspresję receptorów estrogenowych α , β oraz receptorów progesteronowych oceniano w jądrach komórek nowotworowych. (rycina 3). Za wynik dodatni uznano reakcję barwną w co najmniej 10% komórek.



Rycina 3. Nadekspresja jądrowych receptorów ER alfa- powiększenie 400x

Ekspresję receptora HER-2 oceniono za pomocą reakcji barwnej błony komórkowej w raku inwazyjnym. Wynik negatywny to zabarwienie oceniane jako 0 i + (1+), za wynik pozytywny uznano zabarwienie +++ (3+) (rycina 4), wszystkie zabarwienia określone ++ (2+) określono jako wyniki graniczne lub niejednoznaczne i skierowano do oceny amplifikacji genu *HER2* metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Wynik badania FISH wyrażano jako stosunek liczby kopii genu *HER2* do liczby kopii chromosomu 17 w komórkach raka naciekającego. Wskaźnik powyżej 2,2 oznaczał amplifikację, wynik pozytywny.



Rycina 4. Nadekspresja błonowego receptora HER2 (3+) - powiększenie 400x

EGFR, CK5/6, CK14, Vimentyna, BRCA1 oceniano w dwustopniowej skali, gdzie:

0- oznaczało brak reakcji barwnej,

1-oznaczało reakcję barwną

BRCA1 i E-kadherynę oceniano w dwustopniowej skali, gdzie:

0- oznaczało reakcję barwną < 50% komórek

1- oznaczało reakcję barwną \geq 50% komórek

Bcl-2 oceniano także w dwustopniowej skali, gdzie:

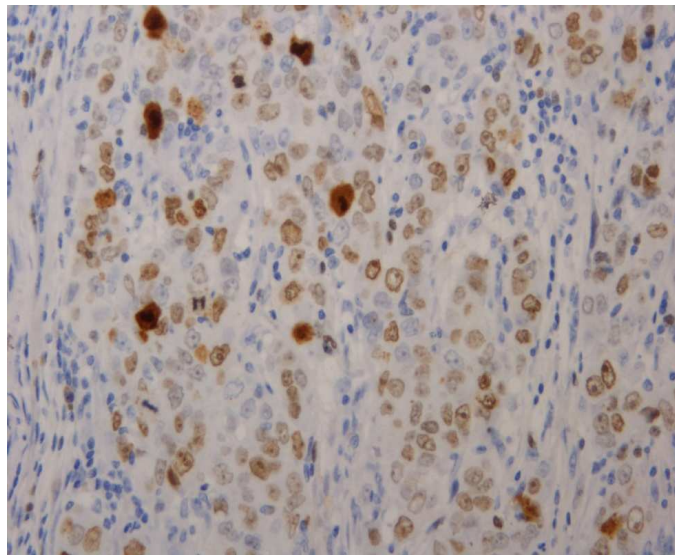
0- oznaczało reakcję barwną w <10% komórek

1- oznaczało reakcję barwną w $\geq 10\%$ komórek

Wskaźnik proliferacji Ki 67 oceniano zgodnie z wytycznymi St.Galen 2010, gdzie:

0 - wybarwienie $<15\%$

1 - $\geq 15\%$ (rycina 5).



Rycina 5. Ekspresja Ki-67 $>50\%$ w jądrach komórek raka przewodowego naciekającego-
powiększenie 400x

Zawartość białka p53 w komórkach nowotworowych oceniano w skali:

0)- brak reakcji barwnej

1)- reakcja od 1-10%

2)- 11-50%

3)- powyżej 50%

4.5 Statystyczna ocena wyników

Zmienne ilościowe (wiek, czas przeżycia, czas do wystąpienia przerzutów) przedstawiono jako średnią arytmetyczną wraz z odchyleniem standardowym oraz wartościami ekstremalnymi (minimum, maksimum).

Zmienne jakościowe dychotomiczne wyrażano jako liczbę (procent) zaobserwowanych przypadków. W analizie powiązań tych cech zastosowano test dokładny Fishera. Zmienne jakościowe kategoryjne o liczbie poziomów >2 prezentowano jako liczbę (procent) zaobserwowanych przypadków, a różnice między tymi zmiennymi oceniano za pomocą testu Chi-kwadrat. Dla oceny funkcji przeżywalności zastosowano metodę Kaplana-Meiera oraz metodę tabel trwania życia. Wpływ wybranych czynników na przeżycie oceniano metodą regresji proporcjonalnego hazardu Coxa. Jako poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$. W obliczeniach wykorzystano system analizy danych StatSoft, Inc (2010) STATISTICA (data analysis software system) version 9.1 www.statsoft.com, nr licencji JXNP010B316627AR-K.

5. WYNIKI

5.1 Typy histologiczne raka piersi występujące w analizowanych populacjach chorych

Najczęściej rozpoznawanym typem raka piersi w obu grupach był rak przewodowy inwazyjny. W grupie kontrolnej stwierdzono częstsze występowanie raka zrazikowego oraz innych typów raka piersi odpowiednio 4,65% i 20,93% , w porównaniu do grupy badanej (odpowiednio 2,02% i 15,15%) [Tab 1].

Tabela 1. Występowanie poszczególnych typów histologicznych raka piersi w grupach badanej i kontrolnej

Grupa	Rak przewodowy	Rak zrazikowy	Inne typy raka	Nie można określić typu	Liczebność grupy
Badana n (%)	78 (78,79)	2 (2,02)	15 (15,15)	4 (4,04)	99 (100)
Kontrolna n (%)	53(61,63)	4(4,65)	18(20,93)	11(12,79)	86(100)

5.2 Złośliwość histologiczna, stopień zaawansowania i inne niekorzystne cechy prognostyczne guzów nowotworowych w analizowanych populacjach chorych

U młodych pacjentek statystycznie częściej rozpoznawano raki o wysokim stopniu złośliwości charakteryzujące się wyższą atypią, częstszymi mitozami i rzadszym tworzeniem cewek [Tab. 2]

Tabela 2. Występowanie określonych histologicznych cech złośliwości w poszczególnych grupach chorych

Cecha		Grupa badana liczba (%)	Grupa kontrolna liczba (%)	P
Stopień złośliwości histologicznej(G)	G1	4 (4,04)	16 (18,60)	<0,00001
	G2	37 (37,37)	39 (45,35)	
	G3	50 (50,51)	17 (19,77)	

	Gx	8 (8,08)	14 (16,28)	
Obecność atypii	1	0(0,00)	7 (10,00)	<0,00001
	2	30 (32,97)	44 (62,86)	
	3	61 (67,03)	19 (27,14)	
Tworzenie cewek	1	3 (3,30)	8 (11,43)	0,006
	2	18 (19,78)	24 (34,29)	
	3	70 (76,92)	38 (54,29)	
Obecność mitoz	1	24 (26,37)	33 (47,14)	0,004
	2	29 (31,86)	23 (32,86)	
	3	38(41,86)	14(20,00)	

W grupie młodych chorych stwierdzono znamienne wyższe miejscowe zaawansowanie procesu nowotworowego zarówno w odniesieniu do wielkości guza pierwotnego (cecha T) jak i ilości zajętych węzłów chłonnych (cecha T) [Tab. 3].

Tabela 3. Stopień zaawansowania miejscowego guza nowotworowego w badanych grupach

Cecha		Grupa badana liczba (%)	Grupa kontrolna liczba (%)	<i>P</i>
Wielkość guza (cecha T wg. AJCC)	≤2cm (T1)	46(47,92)	58(69,88)	<0,00001
	2-5cm (T2)	41(42,71)	10(12,05)	
	≥5cm (T3)	5(5,20)	1(1,20)	
	x* (Tx)	4(4,17)	14(16,87)	
Zajęcie pachowych węzłów chłonnych – cecha N wg. AJCC	N0	46(46,46)	69(83,13)	<0,00001
	N1	29(29,29)	12(14,46)	

	N2	18(18,18)	2(2,41)	
	N3	6(6,07)	0(0,00)	
Pachowe węzły chłonne (N)	N0	46(46,46%)	69(83,13)	<0,0001
	N1-3	53(53,54)	14(16,87)	

W populacji chorych starszych znamienne rzadziej stwierdzano występowanie takich niekorzystnych czynników prognostycznych jak naciekanie przez nowotwór torebki węzła chłonnego oraz inwazja naczyń chłonnych czy krwionośnych komórkami raka. Z kolei występowanie nacieczenia brodawki sutkowej i skóry przez komórki nowotworowe było podobne w obu grupach [Tab.4].

Tabela 4. Występowanie innych, niekorzystnych czynników prognostycznych w badanych grupach

Cecha		Grupa badana liczba (%)	Grupa kontrolna Liczba (%)	<i>P</i>
Inwazja torebki węzłów chłonnych	nieobecne	79(79,80)	76(91,57)	0,023
	obecne	20(20,20)	7(8,43)	
Inwazja naczyń chłonnych i krwionośnych	nieobecne	68(68,69)	76(89,41)	0,005
	obecne	31(31,31)	9(10,59)	
Nacieczenie skóry	nieobecne	95(95,96)	83(97,65)	0,515(ns)
	obecne	4(4,04)	2(2,35)	
Nacieczenie brodawki sutkowej	nieobecne	94(94,95)	78(91,76)	0,384(ns)
	obecne	5(5,05)	7(8,24)	

5.3 Ekspresja receptorów steroidowych i HER2 w komórkach raka piersi

W guzach pierwotnych u młodych chorych znamiennie rzadziej stwierdzano obecność receptorów estrogenowych [Tab. 5A]. U kobiet po menopauzie receptory te wykrywano u 70% chorych, a w populacji młodych pacjentek u 29% [Tab. 5A].

Analogicznie, w grupie chorych starszych w guzach pierwotnych częściej stwierdzano ekspresję receptorów progesteronowych jednak różnica ta nie była istotna statystycznie.

W grupie badanej obecność tych receptorów wykryto w 46,5% a w grupie kontrolnej w 57,6% przypadków [Tab. 5B].

Tabela 5. Ekspresja receptorów hormonalnych w guzach nowotworowych

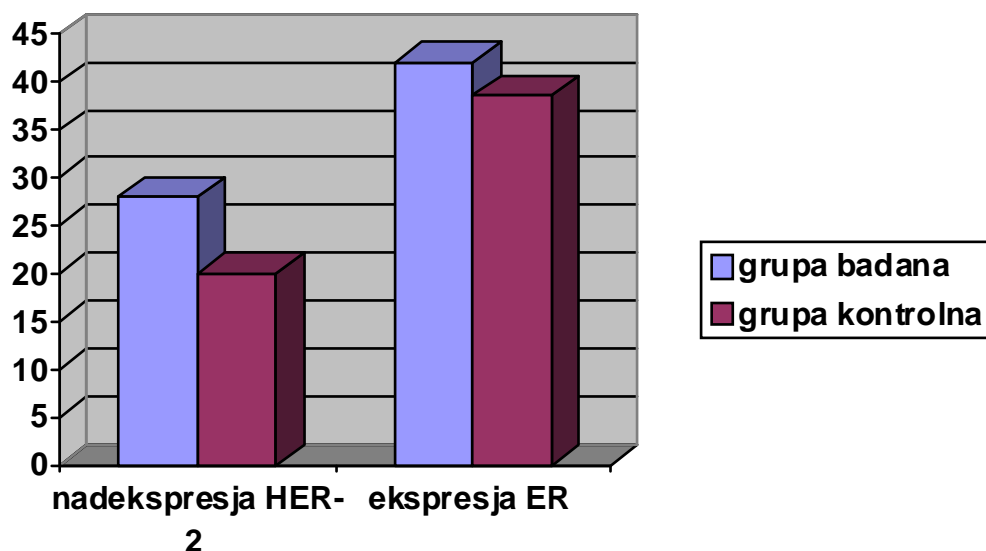
A			
Grupa	Receptory estrogenowe nieobecne liczba(%)	Receptory estrogenowe obecne liczba(%)	<i>P</i>
Badana	57 (57,58)	42 (42,42)	0,0001
Kontrolna	25 (29,41)	60 (70,59)	
B			
Grupa	Receptory progesteronowe nieobecne liczba(%)	Receptory progesteronowe obecne liczba(%)	<i>P</i>
Badana	53 (53,54)	46 (46,46)	0,163
Kontrolna	36 (42,36)	49 (57,64)	(ns)

Analiza ekspresji receptorów progesteronowych i HER2 pomiędzy grupami nie była istotna statystycznie [Tab. 5] i [Tab. 6].

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w częstości występowania raków piersi wykazujących nadekspresję receptora HER2. W grupie chorych młodych nadekspresję receptora HER2 obserwowano w 28,3%, a w grupie kontrolnej w 24,1% przypadków [Tab. 6] i (rycina 6).

Tabela 6. Ekspresja receptora HER2 w komórkach raka piersi

	HER2 - brak nadekspresji i/lub FISH (-) n (%)	HER2 - nadekspresja i/lub FISH (+) n (%)	<i>P</i>
Grupa badana	71(71,72)	28(28,28))	0,522(ns)
Grupa kontrolna	63(75,90)	20(24,10)	



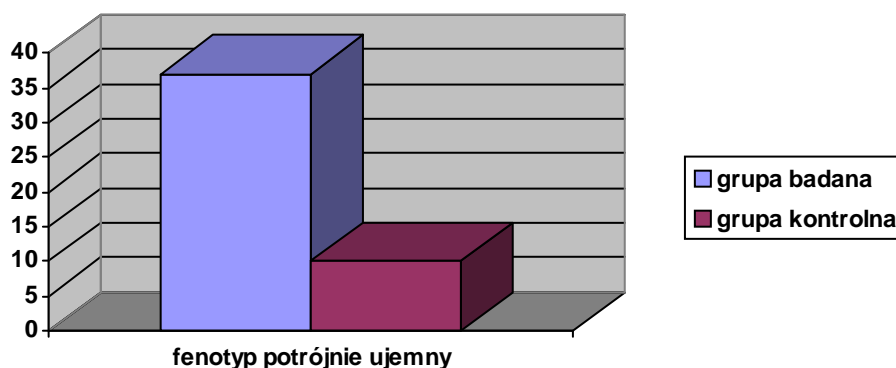
Rycina 6. Porównanie ekspresji receptorów HER2 i ER w grupie badanej i kontrolnej

W populacji chorych młodych ponad trzykrotnie częściej występował rak piersi o fenotypie potrójnie ujemnym (37,4% przypadków) wobec 11,8% przypadków w grupie kontrolnej.

Częstość występowania raka potrójnie ujemnego różniła się istotnie pomiędzy badanymi populacjami [Tab. 7] i (rycina 7).

Tabela 7. Częstość występowania potrójnie ujemnego raka piersi

Grupa	Fenotyp inny niż potrójnie ujemny liczba (%)	Fenotyp potrójnie ujemny liczba (%)	<i>P</i>
Badana	62 (62,63))	37 (37,37)	0,00004
Kontrolna	75 (88,24)	10 (11,76)	



Rycina 7. Porównanie występowania fenotypu potrójnie ujemnego w grupie badanej i kontrolnej

5.4. Immunohistochemiczna ocena dynamiki proliferacji komórkowej.

W oparciu o ocenę ekspresji białka Ki-67 wykazano, że komórki raka piersi u chorych młodszych charakteryzowały się istotnie wyższą dynamiką proliferacji w porównaniu do chorych starszych. U 68% chorych w grupie kontrolnej stwierdzano indeks proliferacyjny Ki-67 poniżej 15%, podczas gdy taką niską dynamikę proliferacji obserwowano jedynie u 28% młodych pacjentek [Tab.8].

Tabela 8. Ocena indeksu proliferacyjnego w guzach nowotworowych

Parametr	Grupa badana liczba(%)	Grupa kontrolna liczba(%)	<i>p</i>
Ki67 ≤15%	28(29,17)	55(67,90)	<0,0001
Ki67 >15%	68 (70,83)	26(32,10)	

5.5 Analiza ekspresji białek o dyskusyjnym znaczeniu prognostycznym

W przeprowadzonych badaniach oceniano również różnice w ekspresji białek mających potencjalne znaczenie prognostyczne. Do takich białek należą – białko naprawy DNA – BRCA1, białko anti-apoptotyczne – Bcl2 oraz białko adhezyjne – E-kadheryna. W grupie młodych chorych stwierdzono znamienne niższą ekspresję BRCA1 i E-kadheryny w porównaniu do starszych osób. Z kolei wybarwienie Bcl-2 powyżej 10% uzyskano częściej w grupie kontrolnej (80,25% vs.68,10%), zależność ta nie jest istotna statystycznie [Tab.9].

Tabela 9. Analiza immunohistochemiczna białek o potencjalnym znaczeniu prognostycznym

Parametr	Grupa badana	Grupa kontrolna	<i>P</i>	CI 95%
BRCA1 <50%	82(85,42)	44(57,14)	<0,0001	2,41-10,6
BRCA1 ≥50%	14(14,58)	33(42,86)		
E-kadheryna <50%	84(95,45)	48(60,00)	<0,0001	4,67-42,0
E-kadheryna ≥50%	4(4,55)	32(40,00)		
Bcl-2 <10%	30(31,90)	16(19,75)	0,068	
Bcl-2 ≥10%	64(68,10)	65(80,25)		

5.6 Analizy immunohistochemiczne białek determinujących właściwości biologiczne komórek raka piersi.

W poszukiwaniu potencjalnych czynników prognostycznych w oparciu o metody immunohistochemiczne oznaczano obecność białek kontrolujących różnorodne procesy biologiczne zachodzących w komórkach nowotworowych. W populacji młodych chorych

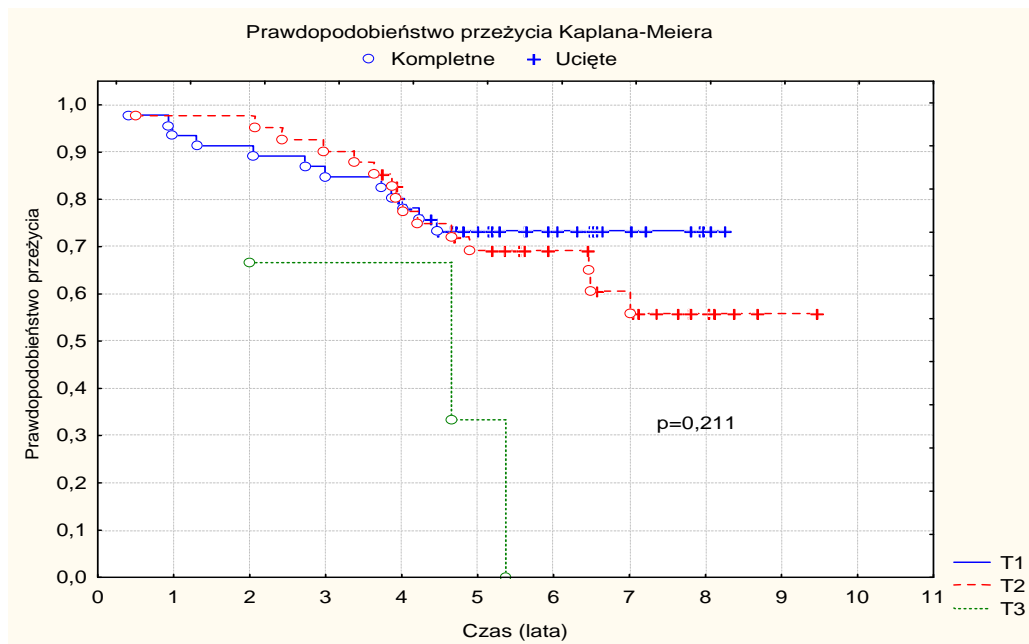
istotnie częściej stwierdzano ekspresję cytokeratyn- CK 5/6, CK14 i receptora EGFR oraz brak ekspresji receptora estrogenowego beta w porównaniu do starszych pacjentek [Tab.10].

Tabela 10. Analiza immunohistochemiczna ekspresji wybranych receptorów oraz elementów cytoszkieletu komórkowego.

Parametr	Grupa badana liczba(%)	Grupa kontrolna liczba(%)	<i>P</i>
CK5/6 (-)	62(65,95)	70(87,5)	0,0009
CK5/6 (+)	32(34,05)	10(12,5)	
CK14 (-)	24(26,37)	46(65,71)	<0,0001
CK14 (+)	67(73,63)	24(34,29)	
EGFR(-)	12(13,33)	19(27,14)	0,029
EGFR(+)	78(86,67)	51(72,86)	
ERβ(-)	44(44,44)	20(23,80)	0,021
ERβ(+)	52(55,56)	64(76,20)	
P53(-)	19(20,21)	32(42,11)	0,002
P53(+)	75(79,79)	44(57,89)	
Vimentyna(-)	70(76,92)	31(68,89)	0,318ns
Vimentyna (+)	21(23,08)	14(31,11)	

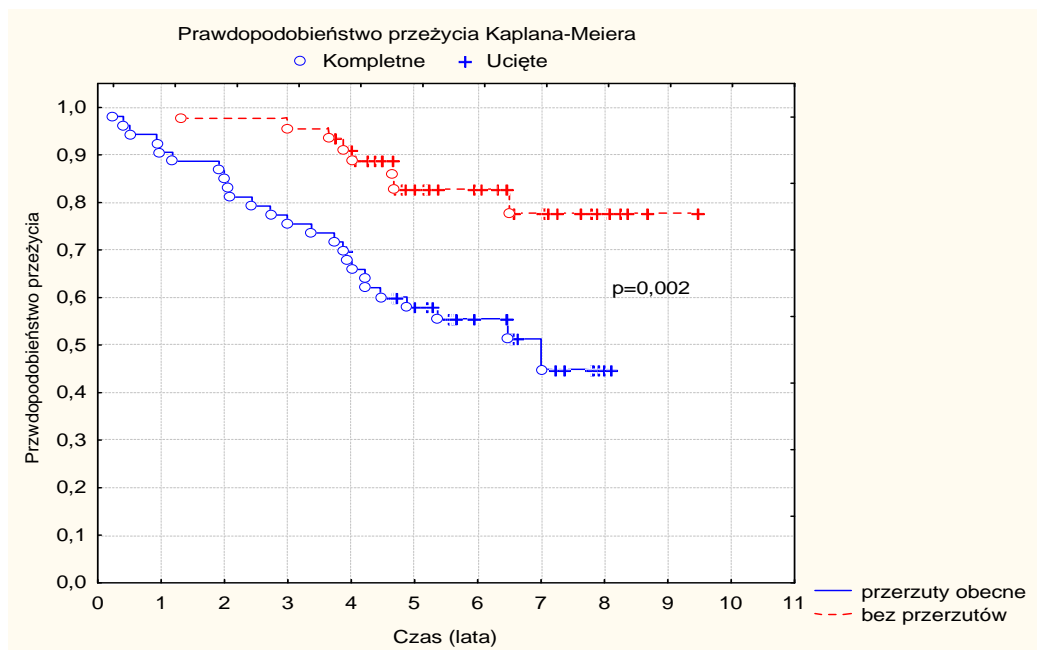
5.7 Analizy zależności czasu przeżycia całkowitego w populacji młodych chorych na raka i przeżyć całkowitych od wybranych cech klinicznych, patologicznych i molekularnych.

Analizując ocenę przeżycia całkowitego w grupie chorych młodych do 35 roku życia nie wykazano różnic w zależności od wielkości guza pierwotnego (rycina 8).



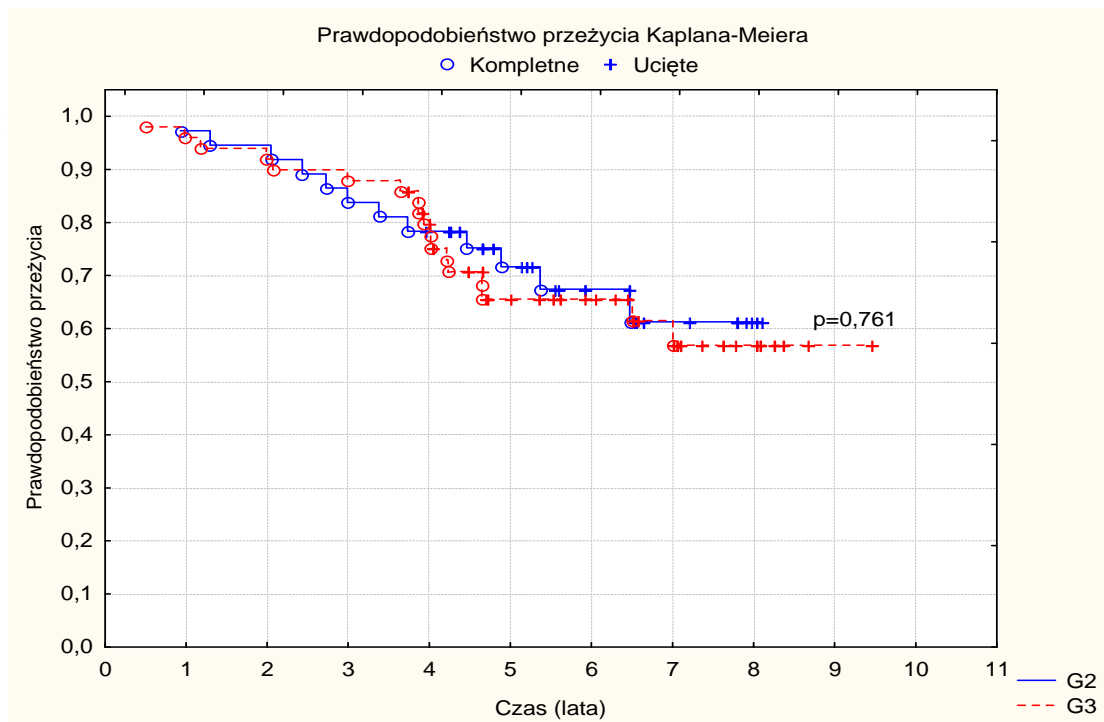
Rycina 8. Czas całkowitego przeżycia chorych < 35 lat w zależności o wielkości guza pierwotnego (cecha T1-T3)

Wykazano natomiast znamienne różnice w czasie przeżycia całkowitego w zależności od obecności przerzutów do pachowych węzłów chłonnych. Mediana czasu przeżycia całkowitego wynosiła 3,9 lat w populacji chorych bez zajętych węzłów chłonnych i 3,0 lat u chorych z cechą N+ ($p=0,002$) (rycina 9).

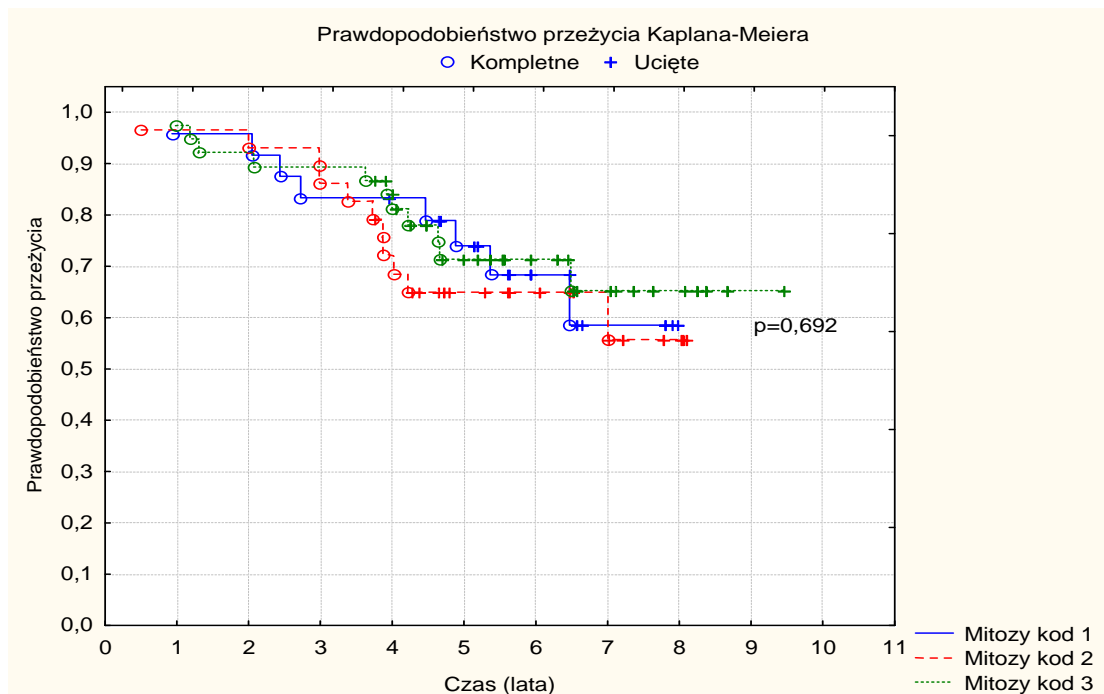


Rycina 9. Czas przeżycia całkowitego młodych chorych w zależności od obecności przerzutów w pachowych węzłach chłonnych.

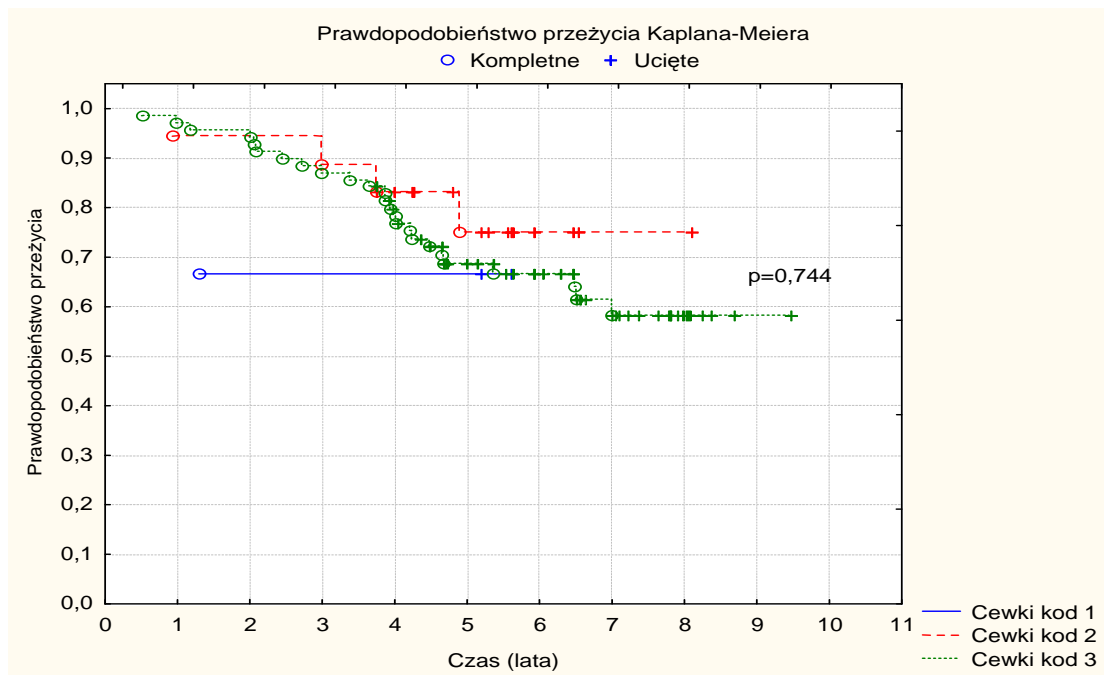
Analizując krzywe czasu przeżycia całkowitego w zależności od cechy G nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami. Wśród chorych z niskim stopniem złośliwości histologicznej G1 nie odnotowano żadnego zgonu (rycina 10). Podobne wyniki uzyskano analizując czas przeżycia całkowitego w zależności od dwóch parametrów oznaczanych przy ustalaniu stopnia złośliwości histologicznej, a mianowicie obecności mitoz oraz tworzenia cewek przez komórki raka (ryciny 11 i 12). Wykazano natomiast znamienne różnice w czasie przeżycia całkowitego młodych chorych w zależności od występowania atypii komórkowej (polimorfizmu jąder), mediana czasu przeżycia chorych z guzami o wysokiej atypii wynosiła 3,9 lat, a w przypadku chorych z niską atypią 3,6 lat ($p=0,046$) (rycina 13).



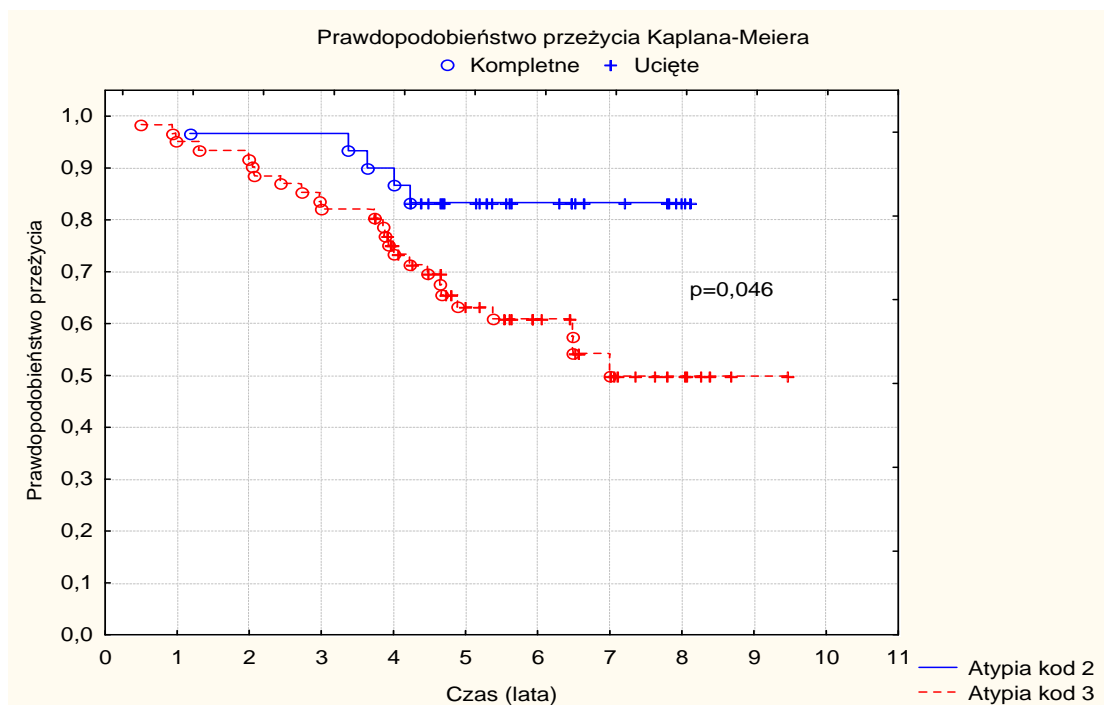
Rycina 10. Czas przeżycia całkowitego w zależności od cechy G.



Rycina 11. Czas przeżycia całkowitego w zależności od występowania mitoz w jądrach komórek nowotworowych. Kod1 – mała ilość mitoz, kod 2 – pośrednia ilość mitoz, kod 3 - duża ilość mitoz.

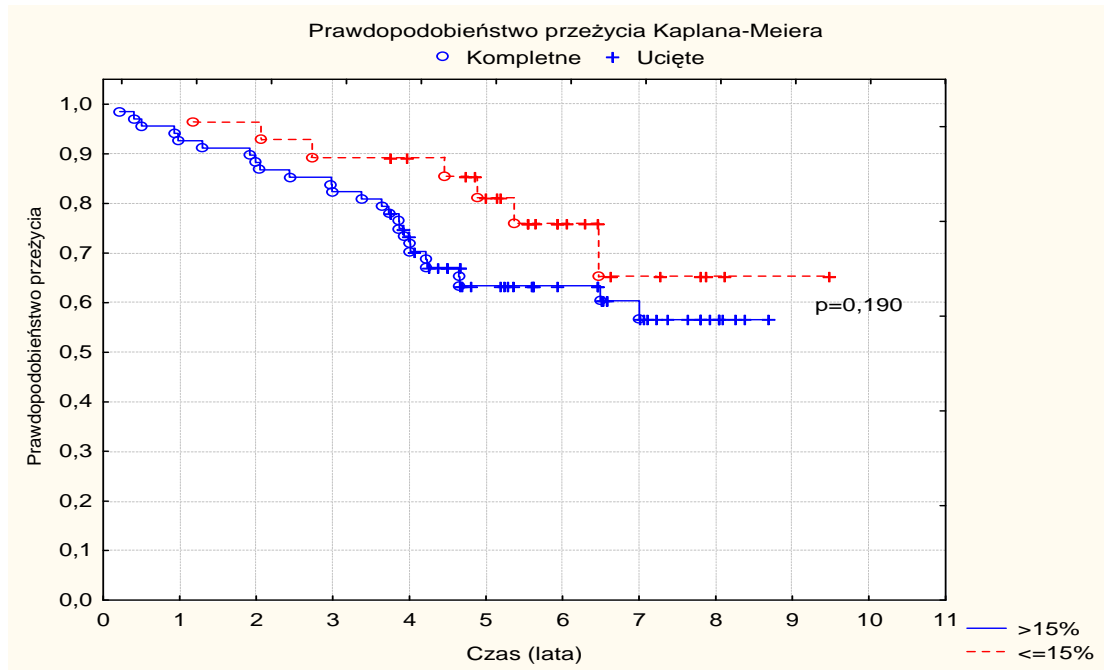


Rycina 12. Czas przeżycia całkowitego w zależności od tworzenia cewek. Kod 1 oznacza tworzenie >75% cewek, a kod 3 tworzenie <10% cewek

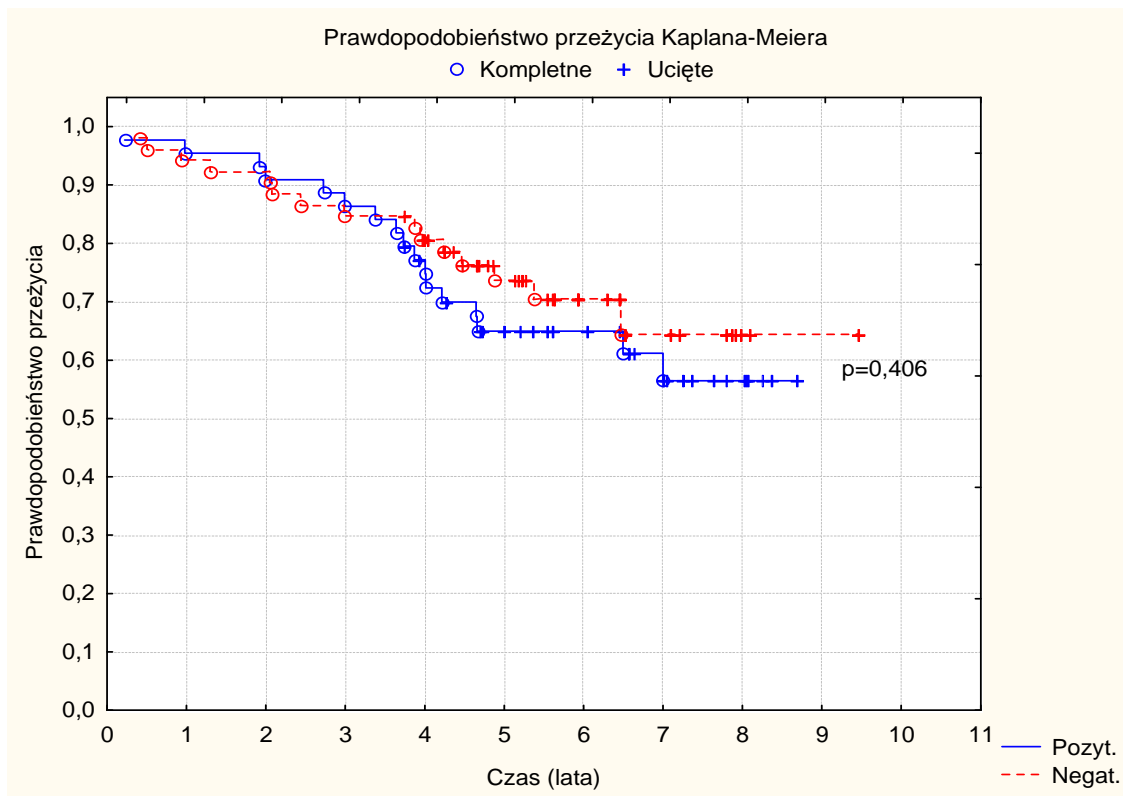


Rycina 13. Czas przeżycia całkowitego w zależności od atypii jądrowej. Kod 3 oznacza wysoką atypię, a kod 2 pośrednią atypię.

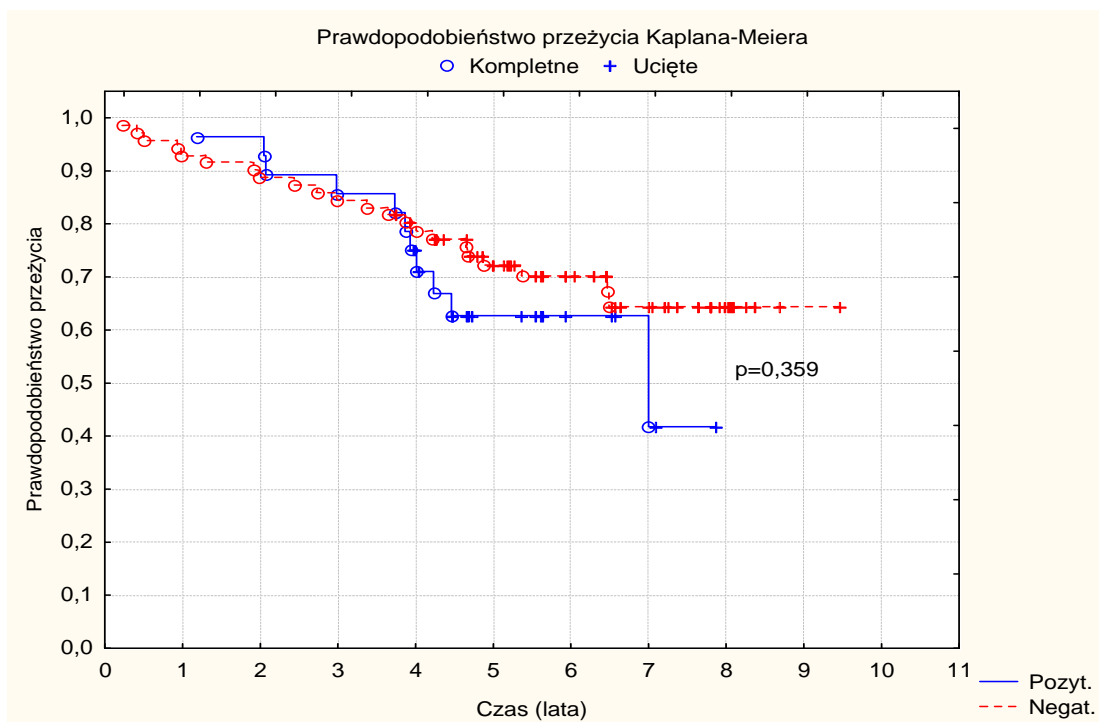
Nie wykazano także różnic w czasie przeżycia całkowitego młodych chorych w zależności od indeksu proliferacyjnego guza (ekspresja Ki-67), obecności receptorów estrogenowych i HER2 (ryciny 14-16).



Rycina 14. Czas przeżycia całkowitego w zależności od ekspresji Ki-67

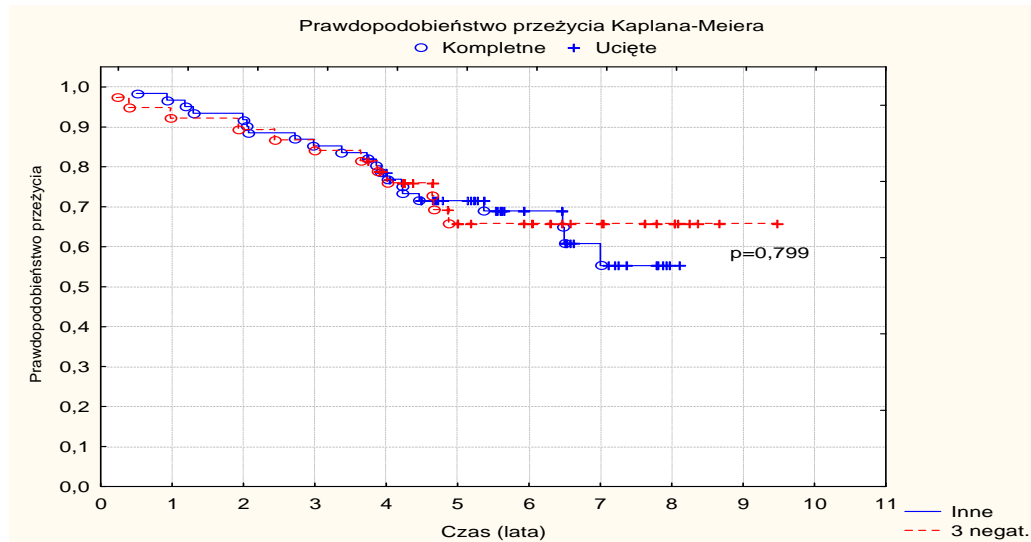


Rycina 15. Czas przeżycia całkowitego w zależności od ekspresji jądrowych receptorów estrogenowych



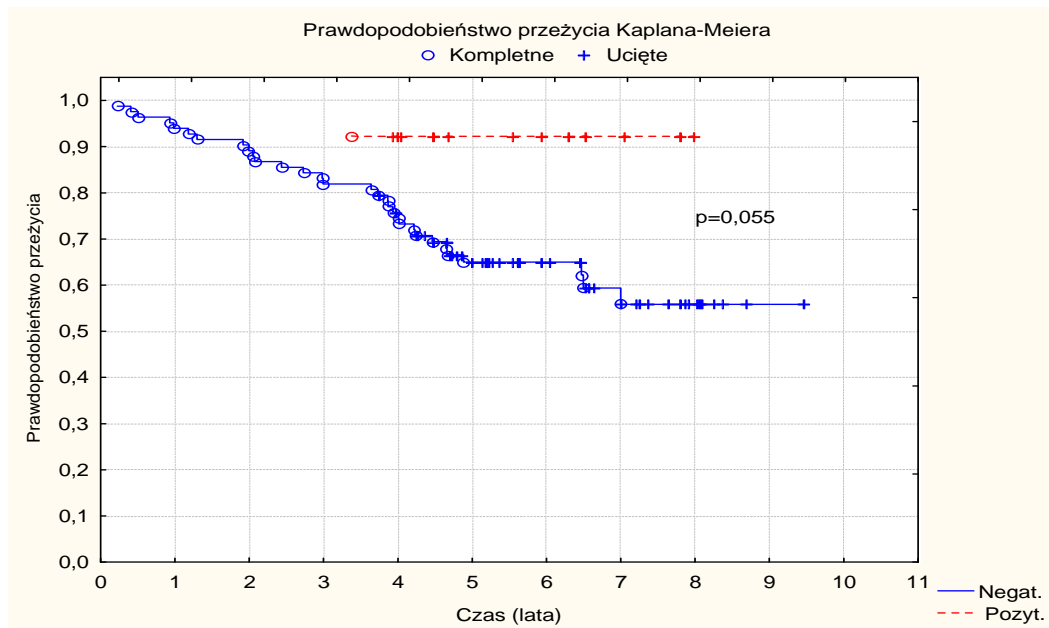
Rycina 16. Krzywe przeżycia całkowitego w zależności od obecności receptora błonowego HER2

Nie stwierdzono także znamiennej różnicy w czasie przeżycia całkowitego pomiędzy populacją chorych z guzem o fenotypie potrójnie ujemnym a populacjami chorych z guzami o innym fenotypie (rycina 17).



Rycina 17. Czas przeżycia całkowitego u chorych o fenotypie potrójnie ujemnym (3 neg.) w porównaniu do innych fenotypów raka

Wykazano wyraźny trend w kierunku dłuższego przeżycia całkowitego chorych, u których w komórkach raka piersi wykazano ekspresję białka BRCA1 na poziomie >50% porównaniu do chorych z niższą ekspresją lub całkowitym brakiem ekspresji tego białka (rycina 18).



Ryc. 18. Czas całkowitego przeżycia chorych w zależności od ekspresji białka BRCA1 w komórkach guza. Kod 'Negat' – ekspresj BRCA1 na poziomie $\leq 50\%$, 'Pozyt' – ekspresja BRCA1 $> 50\%$.

6. DYSKUSJA

Rak piersi u młodych kobiet ma inną biologię niż w starszych grupach wiekowych i zazwyczaj przebiega bardziej agresywnie. Od długiego czasu poszukuje się mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za szybki rozwój i progresję raka piersi u młodych kobiet, które mogłyby służyć jako potencjalne czynniki prognostyczne i predykcyjne. Poszukiwania takie prowadzone są zarówno na poziomie genów – ocena polimorfizmów, mutacji w obrębie DNA, oraz aktywacji transkrypcji określonych genów przy użyciu mikromacierzy RNA, a także na poziomie białek z wykorzystaniem technik immunohistochemicznych. W odróżnieniu od analiz genetycznych, wymagających prospektywnego gromadzenia materiału biologicznego, analizy immunohistochemiczne mogą być przeprowadzane na archiwalnym materiale tkankowym. Dlatego też, w niniejszej pracy z racji jej retrospektywnego charakteru zastosowano techniki immunohistochemiczne w celu oceny profilu niekorzystnych cech biologicznych występujących w rakach piersi u młodych kobiet.

W przedstawionym badaniu populacja młodych chorych obejmowała kobiety, które w momencie rozpoznania raka piersi nie przekraczały 35 roku życia. W literaturze nie ma jednoznacznej definicji pojęcia ‘młoda chora’. Najczęściej określeniem „młoda” posługiwano się w stosunku do kobiet przed 40-tym rokiem życia [47]. W innych badaniach, autorzy dowodzili, że młode chore, to takie, które miesiączkują, czyli za wiek graniczny uznawano 50-ty rok życia [48]. W niniejszym badaniu oparto się na definicji zawartej w The Women’s Health Initiative (WHI) [22], i jako młode uznano kobiety do 35 roku życia. Ustalenia konferencji w St. Gallen w 2005 roku i latach późniejszych potwierdziły, że wiek do 35 roku życia jest niezależnym, niekorzystnym czynnikiem prognostycznym[29].

W populacji młodych chorych częściej stwierdzano guzy o wielkości 2-5cm (cecha T2 wg AJCC). Zmiany o tych rozmiarach są zazwyczaj wykrywane przypadkowo przez same chore. W grupie kontrolnej, w której z racji wieku stosowano rutynowe badania

mammograficzne, znacznie częściej wykrywano guzki mniejsze o średnicy nieprzekraczającej 2cm. Wielkość guza pierwotnego jest jednym z kluczowych parametrów branych pod uwagę podczas podejmowania decyzji odnośnie sposobu leczenia uzupełniającego.

W przedstawionym badaniu cechę T2 stwierdzono u 42,71% chorych, natomiast w grupie kontrolnej u 12,05%. Rochefordiere i wsp. w swojej pracy stwierdzili, że u kobiet poniżej 33 roku życia, guzy o wymiarach 2-5cm występowały w 46% przypadków [48]. Natomiast Qerzoli w grupie 37 chorych do 35 roku życia znalazł 47% pacjentek z guzem o średnicy przekraczającej 2 cm [49]. Na szczególną uwagę zasługuje opracowanie Maggard i wsp., którzy w dużym badaniu populacyjnym stwierdzili guzy wielkości T2 u 54% młodych kobiet, podobne wyniki otrzymał Marou (56%) [50,26]. W badaniu Gajdosa częstość występowania guzów \geq T2 wynosiła 36% [23].

Kolejnym, istotnym czynnikiem wpływającym na rokowanie jest obecność przerzutów do pachowych węzłów chłonnych. W przedstawionej pracy znamienne częściej występowały one u młodych chorych - 53,53%. U zdecydowanej większości starszych pacjentek (83,13%) w badaniu histopatologicznym nie stwierdzono przerzutów do węzłów chłonnych. Podobne wyniki uzyskał w 2000 roku Kroman [51]. Sidoni natomiast wykrył przerzuty do węzłów chłonnych u 53% chorych do 40 roku życia i u 45% powyżej 60 roku życia, jednak liczebność obu grup była niewielka [52].

Do uznanych czynników prognostycznych w raku piersi należy również typ histologiczny guza. U chorych poddanych analizie najczęściej stwierdzano raka przewodowego inwazyjnego, który w grupie badanej występował w 78,79%, a w kontrolnej w 61,61%. U chorych starszych zaobserwowano też częstsze występowanie raka zrazikowego i innych typów raka piersi, zależność ta nie była jednak istotna statystycznie. Pacjentki starsze z wczesnym rakiem piersi rutynowo otrzymywały neoadjuwantowe leczenie cytostatykami, w tej grupie chorych w 12,79% przypadków nie udało się ustalić typu nowotworu ze względu na

całkowitą remisję raka. W 2006 roku nie wykonywano jeszcze rutynowo oceny histologicznej guza przed rozpoczęciem leczenia indukcyjnego. Można przypuszczać, że u wielu z tych chorych także występował typ przewodowy i odsetek rozpoznań raka przewodowego w obu grupach byłby porównywalny. W dostępnym piśmiennictwie nie stwierdza się istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi w występowaniu określonych typów histologicznych raka piersi [21,22,23,49,53].

Jednym z najważniejszych czynników prognostycznych w raku piersi jest stopień złośliwości histologicznej. W przeprowadzonym badaniu u połowy (50,51%) młodych pacjentek stwierdzano raki niskozróżnicowane G3, natomiast u starszych chorych ten stopień złośliwości występował tylko w 19,77% przypadków. Zależność ta była istotna statystycznie. Natomiast w grupie kontrolnej częściej występowały guzy G2. W celu określenia stopnia złośliwości histologicznej analizuje się trzy parametry - atypię (pleomorfizm jąder), liczbę mitoz w polu widzenia oraz tworzenie cewek przez komórki raka. Statystycznie częściej wszystkie te zjawiska występowały w guzach u kobiet młodych. W tej populacji wysoką atypię odnotowano w 67,03%, częstsze mitozy w 41,86%, a brak tworzenia cewek w 76,92% przypadków. Podobne wyniki w stosunku do młodych kobiet uzyskał Querzoli i Maggard [49,50]. Inni autorzy stwierdzali wysoki stopień złośliwości histologicznej guza u młodych chorych zdecydowanej większości przypadków ($\geq 80\%$) [23,51,52]. Parametry powyższe są niezbędne dla określenia rokowania.

Nacieczenie torebki węzła chłonnego oraz inwazja komórek nowotworowych w okołoguzowych naczyniach chłonnych i krwionośnych stanowią niekorzystne zjawiska brane pod uwagę przy planowaniu leczenia uzupełniającego. Znamienne częstsze występowanie tych parametrów w populacji młodych chorych (naciek torebki węzła - 20,20%, inwazja naczyń - 31,31%) świadczą o zdecydowanie gorszym rokowaniu w tej grupie chorych. W dostępnym piśmiennictwie naciekanie naczyń okołoguzowych u chorych w wieku poniżej 40

lat obserwowano u 21,2% pacjentek [54]. W niniejszym badaniu odsetek ten jest wyższy, co może być związane z młodszym wiekiem analizowanych chorych, nieprzekraczającym zdefiniowanej krytycznej granicy 35 lat. Do czynników prognostycznych i predykcyjnych zalicza się również ekspresję receptorów hormonalnych i HER 2 w komórkach raka piersi. Ich obecność pozwala nie tylko ocenić rokowanie, ale także ustalić przewidywaną odpowiedź na leczenie systemowe. W populacji wszystkich kobiet chorych na raka piersi receptory estrogenowe α (ER) wykrywane są w komórkach nowotworowych w 60-80% przypadków. W niniejszym badaniu u kobiet po menopauzie odsetek ten wynosił 70,59%, natomiast zdecydowanie rzadziej stwierdzano obecność ER w grupie młodych chorych (42,42%). W kilku innych badaniach obejmujących średnio 116 (44-185) młodych chorych poniżej 35 roku życia ekspresja ER obserwowana była jedynie w 43% przypadków (20-61%) [23,26,56]. Z uwagi na częstsze występowanie hormononiezależnego raka piersi, większość młodych chorych nie jest poddawana uzupełniającemu leczeniu hormonalnemu. Również, ekspresja receptorów progesteronowych (PgR) stanowiąca korzystny czynnik prognostyczny była stwierdzana częściej w grupie kontrolnej. U większości młodych chorych nie wykrywano ekspresji receptorów hormonalnych, jednak różnica w częstości ekspresji PgR pomiędzy badanymi populacjami nie była istotna statystycznie. Zgodnie z obecnymi rekomendacjami terapię hormonalną stosuje się u chorych z rakiem piersi wykazującym ekspresję ER. Metaanaliza badań klinicznych opublikowana w Lancet w 2007 roku wykazała, że chore w wieku <40 lat odnoszą istotną korzyść ze skojarzenia tamoksyfenu z analogami gonadoliberyn [57]. Zgodnie z aktualnymi wytycznymi stwierdzenie ekspresji ER niezależnie od poziomu stanowi przesłankę do wdrożenia uzupełniającej hormonoterapii [14].

W dostępnym piśmiennictwie odsetek młodych kobiet chorych na raka piersi, u których stwierdzono nadekspresję receptora HER2 waha się w granicach 28%-44%. Najprawdopodobniej, rozbieżności te są ponownie związane ze sposobem definiowania wieku

młodych kobiet. W niniejszym badaniu nadekspresję HER2 stwierdzono u 28% chorych młodych i 24% chorych w starszym wieku. Podobne wyniki uzyskał Berthau, jednak liczebność grupy młodych chorych u tego autora była o połowę mniejsza niż w niniejszym badaniu [23,26,27,58,59,60]. Żadna z pacjentek operowanych w latach 2002-2006, u których stwierdzono nadekspresję HER2 nie otrzymała leczenia uzupełniającego transtuzumabem, ponieważ w tamtym okresie lek ten nie był zarejestrowany w terapii adjuwantowej. Wszystkie chore zostały poddane uzupełniającej chemioterapii opartej głównie o antracykliny i cyklofosfamid, niektóre z nich otrzymywały również taksany.

W grupie badanej u ponad jednej trzeciej chorych (37%) stwierdzono fenotyp potrójnie ujemny, natomiast w grupie kontrolnej odsetek chorych z tym typem raka piersi wynosił tylko 10%. Pacjentki z potrójnie ujemnym rakiem piersi niewykazującym ekspresji ER, PgR i HER2 mają gorsze rokowanie i praktycznie zawsze wymagają uzupełniającej chemioterapii. Należy jednak pamiętać, że fenotyp potrójnie ujemny, nie jest synonimem podtypu podstawnego charakteryzującego się gorszym rokowaniem [14,61,62,63]. Podobny odsetek raków potrójnie ujemnych stwierdzili w swoich badaniach Haffty i wsp., jednak jako młode uznali chore do 50 roku życia [21].

Użytecznym wskaźnikiem, przydatnym w podejmowaniu decyzji kwalifikującej do leczenia hormonalnego lub chemioterapii jest oznaczenie tzw. indeksu proliferacyjnego Ki-67, który odpowiada poziomowi ekspresji białka charakterystycznego dla wszystkich faz cyklu komórkowego za wyjątkiem fazy G₀. Zdecydowanie częściej w populacji młodych kobiet (70%) stwierdzano wysoki indeks proliferacyjny (>15%) niż u chorych starszych (32%). Obserwacja ta potwierdza, że rak piersi u młodych chorych charakteryzuje się znacznie wyższą dynamiką wzrostu, co koreluje z gorszym rokowaniem, ale i z większą wrażliwością na chemioterapię [64].

W niniejszej pracy starano się również zidentyfikować inne parametry mogące potencjalnie służyć jako czynniki prognostyczne u młodych chorych na raka piersi. Analizie poddano ekspresję następujących białek - BRCA1, E-kadheryny i Bcl-2.

Białko BRCA1 składa się z 1863 aminokwasów i jest jednym z kluczowych białek regulujących procesy naprawy DNA. Występuje w jądrze komórkowym wielu tkanek, a szczególnie w komórkach proliferujących. Zmniejszenie ekspresji obserwuje się w przyspieszonym wzroście komórek gruczołu piersiowego w modelach *in vitro*, a utrata ekspresji występuje podczas progresji i tworzenia przerzutów w raku piersi. Rola tego białka nie została jeszcze do końca poznana, ale jako potencjalny czynnik prognostyczny wzbudza ono duże nadzieje, ponieważ jest łatwo oznaczane w badaniu immunohistochemicznym. W badaniu własnym obserwowano znamienne statystycznie, niską ekspresję u kobiet młodych (85,42%) w porównaniu do grupy kontrolnej (57,14%). Lambie i Wilson ustalili, że utrata ekspresji BRCA1 koreluje z wysokim stopniem złośliwości histologicznej [65,66]. W późniejszych publikacjach inni autorzy potwierdzili korelację pomiędzy niską ekspresją tego białka a podtypami podstawnymi i potrójnie ujemnymi raka piersi [67,68]. Obserwacja ta może mieć w przyszłości duże znaczenie w doborze leków stosowanych podczas chemioterapii. Niestety na podstawie ekspresji białka BRCA1 w jądrach komórkowych nie można stwierdzić czy u badanej chorej występuje mutacja dziedziczna.

Innym, obiecującym wskaźnikiem prognostycznym może stać się transbłonowa molekula adhezyjna E- kadheryna, odpowiadająca za przyleganie komórkowe. W niniejszym badaniu zaobserwowano niską ekspresję E-kadheryny u 95,45% młodych chorych, natomiast w grupie kobiet starszych tylko u 60%. Niska ekspresja tego białka adhezyjnego koreluje z wielkością guza, wysoką złośliwością histologiczną i rozsiewem choroby nowotworowej [69].

Nadekspresja białka Bcl-2 wiązana jest z lepszym rokowaniem. W badaniach własnych stwierdzono częściej reakcję barwną powyżej 10% uznaną za pozytywną [70] w grupie

chorych starszych, jednak różnice te w obu grupach nie były istotne statystycznie. W piśmiennictwie Bcl-2 opisywany jest jako użyteczny marker pozwalający przewidywać 5-cio letnie przeżycie, porównywalnie do wartości prognostycznych paneli receptorowych.

Niestety, dane na ten temat są sprzeczne i wymagają dalszych badań [41].

W przedstawionej pracy analizowano także inne receptory i elementy cytoszkieletu takie jak: EGRF, ERβ, CK 5/6, CK14, p53 i Vimentynę. W grupie badanej znamienne częściej stwierdzano ekspresję cytokeratyn 5/6, 14, obecność receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu oraz akumulację zmutowanego białka p 53. Taki model immunohistochemiczny charakterystyczny jest dla raka o fenotypie potrójnie ujemnym. Dane te są zbieżne z opracowaniami innych autorów badających populacje młodych chorych na raka piersi [49,52,62,71].

Ekspresja wimentyny – białka włókna pośredniego, które jest częścią struktur podporowych komórek, rzadko spotykana jest w inwazyjnych rakach piersi, a jej obecność wiąże się z występowaniem potencjalnie bardziej agresywnych i chemioopornych guzów. W przedstawionym badaniu analizując ten parametr nie uzyskano znamiennych różnic pomiędzy badanymi populacjami. W niniejszym badaniu nie potwierdzono również potencjalnej roli prognostycznej tego białka analizowanej populacji młodych chorych [72].

Nowym, przydatnym czynnikiem predykcyjnym mogą okazać się receptory estrogenowe beta. W obu grupach ich ekspresja była podobna do receptorów estrogenowych alfa. Wyniki innych autorów są zbieżne z przedstawionymi w tym opracowaniu [73]. Szereg prac wskazuje, że w przyszłości receptory estrogenowe beta mogą stać się nowym celem terapeutycznym [74,75].

Młody wiek jest uznanym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w raku piersi. W szeregu badań wykazano, że kobiety w wieku < 35-40 roku życia mają gorsze rokowanie i krótszy czas przeżycia całkowitego w porównaniu do starszych chorych [76, 77,78]. Oprócz

wieku, uznawanego za niezależny, niekorzystny czynnik prognostyczny istnieje szereg innych parametrów, które mogą pozwolić na zidentyfikowanie wśród młodych chorych na raka piersi grup pacjentek o odmiennym rokowaniu. Określenie, które chore należą do grupy złego lub dobrego rokowania jest niezbędne przy planowaniu leczenia uzupełniającego i opieki po zakończeniu terapii. W populacji młodych chorych uczestniczących w niniejszym badaniu oceniano klasyczne parametry histopatologiczne oraz ekspresję szeregu białek o potencjalnym znaczeniu prognostycznym, które następnie korelowano z czasem przeżycia całkowitego. W badanej populacji 99 chorych na raka piersi w wieku <35 roku życia bezdyskusyjnym, niekorzystnym czynnikiem ryzyka okazał się być status pachowych węzłów chłonnych. Chore, u których stwierdzono obecność przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych miały znamienne krótszy czas przeżycia całkowitego w porównaniu do chorych z cechą N0. Obserwacja ta potwierdza ogromny wpływ stanu węzłów chłonnych na rokowanie chorych na raka piersi niezależnie od wieku [79,80]. W analizowanej populacji młodych chorych nie stwierdzono natomiast znamiennego wpływu wielkości guza pierwotnego na czas przeżycia całkowitego, a jedynie zaobserwowano trend w kierunku krótszego przeżycia u chorych z większymi guzami. W innych badaniach dotyczących ogólnej populacji chorych na raka piersi wielkość guza stanowiła niezależny czynnik prognostyczny [79,80]. Brak stwierdzenia istotnych różnic w czasie przeżycia całkowitego w zależności od cechy T wynika najprawdopodobniej ze zbyt małej liczebności badanych grup, jednak nie można wykluczyć, że w przypadku agresywnego leczenia systemowego, któremu były poddane wszystkie młode chore wielkość guza rzeczywiście nie miała istotnego znaczenia prognostycznego. Stopień złośliwości histologicznej od wielu lat uznawany jest za niezależny czynnik prognostyczny w raku piersi [81]. Jednak, w badanej populacji młodych chorych na raka piersi nie wykazano istotnych różnic w czasie przeżycia całkowitego w zależności od stopnia złośliwości histologicznej (G2 vs. G3). W analizie nie brano pod uwagę cechy G1, ponieważ

ten stopień złośliwości stwierdzono tylko u kilku chorych. W swoim badaniu Rakha i wsp [71] analizując populację ponad 2 tysięcy chorych na raka piersi w wieku <70 lat wykazali istotną korelację czasu przeżycia swoistego dla raka piersi (Breast Cancer Specific Survival) z poszczególnymi stopniami złośliwości histologicznej. Bardzo ciekawą obserwacją w niniejszej pracy wydaje się być prognostyczna rola polimorfizmu jąder komórkowych. W odróżnieniu od dwóch innych parametrów histologicznych niezbędnych do ustalenia stopnia złośliwości raka piersi (ocena mitoz i tworzenie cewek), obecność zaburzeń w budowie jąder okazała się istotnie korelować z czasem przeżycia całkowitego. Nie można wykluczyć, że polimorfizm jąder okaże się przydatny przy definiowaniu grup ryzyka wśród młodych chorych na raka piersi, jednak potwierdzenie tego będzie wymagało prospektywnych badań. Indeks proliferacyjny Ki-67, który od pewnego czasu jest rutynowo oznaczany we wczesnych rakach piersi ma przede wszystkim znaczenie predykcyjne i jest wykorzystywany przy podejmowaniu decyzji odnośnie leczenia uzupełniającego [14]. W swojej pracy Klintman i wsp. [82], wykazali, że Ki-67 ma również znaczenie prognostyczne. W populacji chorych przed menopauzą wykazali znamienne różnice w zakresie czasu przeżycia całkowitego i czasu przeżycia wolnego od choroby w zależności od ekspresji Ki-67 (≤ 20 vs. $> 20\%$). W niniejszej pracy nie stwierdzono natomiast różnic w zakresie czasu przeżycia całkowitego w młodszej grupie wiekowej w porównaniu do badania Klintmana, a dodatkowo zastosowano inny punkt odcięcia (Ki-67 ≤ 15 vs. $> 15\%$), zgodny z rekomendacjami konferencji uzgodnieniowej St Gallen.

Ekspresja receptora estrogenowego jest kolejnym uznanym korzystnym czynnikiem prognostycznym i predykcyjnym u chorych na raka piersi [14,80, 29]. Stwierdzenie obecności receptora estrogenowego w jądrach komórek raka piersi świadczy o hormonowrażliwości i determinuje strategię postępowania terapeutycznego w określonym przypadku. Młode chore <35 roku z hormonozależnym rakiem piersi mają zdecydowanie gorsze rokowanie w

porównaniu do chorych starszych [83]. W przypadku hormonozależnego raka piersi wymagają one hormonoterapii opartej o skojarzenie tamoksyfenu z analogami gonadaoliberyn [57] i zawsze powinny zostać poddane uzupełniającej chemioterapii [51]. W analizowanej w niniejszym badaniu populacji młodych chorych ekspresja receptora estrogenowego okazała się nie mieć znaczenia prognostycznego. Może to świadczyć o tym, że w przypadku bardzo młodych chorych agresywna uzupełniająca chemioterapia ma istotny wpływ na czas przeżycia całkowitego niezależnie od hormonozależności nowotworu i uzupełniającej hormonoterapii.

Ekspresja receptora HER2 jest również uznanym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w ogólnej populacji chorych na raka piersi [84]. W literaturze brakuje jednak informacji na temat prognostycznego znaczenia ekspresji HER2 w populacji młodych chorych na raka piersi. W niniejszym badaniu nie wykazano znamienych różnic, a jedynie trend w kierunku krótszego czasu przeżycia całkowitego młodych chorych na raka piersi z nadekspresją HER2. Zastosowanie agresywnej chemioterapii uzupełniającej mogło przyczynić się do zniwelowania różnic w zakresie czasu przeżycia całkowitego pomiędzy subpopulacjami młodych chorych z prawidłową i nieprawidłową ekspresją HER2. Pomimo niekorzystnego znaczenia prognostycznego nadekspresja HER2 stanowi również czynnik predykcyjny odpowiedzi na chemioterapię opartą o dokсорubicynę, cyklofosfamid i fluorouracyl [85]. Pacjentki z potrójnie ujemnym rakiem piersi bez ekspresji receptorów hormonalnych i nadekspresji HER2 mają zdecydowanie gorsze rokowanie w porównaniu do pacjentek z innymi fenotypami raka [86]. W kanadyjskim badaniu populacyjnym przeprowadzonym na grupie 1500 chorych wykazano, że ryzyko zgonu było trzykrotnie wyższe w populacji chorych na potrójnie ujemnego raka piersi [87]. Wśród chorych na raka o fenotypie potrójnie ujemnym wiek <40 roku życia wydaje się być istotnym niekorzystnym czynnikiem

rokowniczym [88], jednak brak jest w literaturze jednoznacznych informacji na temat wartości prognostycznej tego typu nowotworu u chorych w wieku poniżej 35 lat.

Mutacja lub brak ekspresji BRCA1 w komórkach raka piersi wiąże się z występowaniem niekorzystnych cech patologicznych takich jak fenotyp podstawny (basal-like), brak ekspresji ER, czy wysoki stopień złośliwości histologicznej [89]. W swojej pracy Rakha i wsp. wykazali, że zaburzona ekspresja BRCA1 obserwowana w około 45% przypadków była niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w ogólnej populacji chorych na raka piersi liczącej prawie dwa tysiące kobiet [67]. W badanej populacji młodych kobiet czas przeżycia całkowitego był dłuższy w grupie chorych, u których stwierdzano ekspresję BRCA1. Różnice w czasie przeżycia całkowitego nie osiągnęły jednak znamienności statystycznej, co może być związane z dużą dysproporcją w liczebności grup BRCA1+ vs. BRCA1-(83 vs. 13 chorych).

W większości publikacji dotyczących potencjalnych czynników prognostycznych u młodych chorych na raka piersi ocenia się przede wszystkim czas przeżycia wolnego od choroby, którego analiza wymaga znacznie krótszej obserwacji niż czas przeżycia całkowitego. Czas przeżycia całkowitego jest jednak uważany za podstawowy i najbardziej obiektywny parametr w onkologii. Problematyka raka piersi w bardzo młodym wieku, z racji systematycznie wzrastającej zachorowalności staje się coraz częściej dyskutowanym zagadnieniem. Jednak ilość danych dotyczących zarówno rokowania jak i optymalnego postępowania terapeutycznego w tej szczególnej populacji w porównaniu do starszych grup wiekowych jest ograniczona. Niniejsza praca dostarcza dowodów na wyraźną odmienną raka piersi w populacji chorych przed 35 rokiem życia w porównaniu do starszych chorych zarówno pod kątem parametrów klinicznych jak i molekularnych. Dodatkowo, potwierdza, że wiele uznanych czynników rokowniczych rutynowo stosowanych w analizie ryzyka czy planowaniu leczenia uzupełniającego w ogólnej populacji chorych na raka piersi może nie mieć

uzasadnienia w odniesieniu do bardzo młodych kobiet. Wnioski płynące z niniejszej pracy, w związku z jej retrospektywnym charakterem mają jednak ograniczone przełożenie na praktykę kliniczną i wydają się stanowić hipotezy, które należałoby zweryfikować w prospektywnych badaniach translacyjnych.

7. WNIOSKI

1. Stwierdzono istotne różnice w cechach klinicznych, histologicznych i immunohistochemicznych pomiędzy populacją chorych na raka piersi w wieku poniżej 35 lat a populacją chorych powyżej 56 roku życia
 - a. wielkość guza i częstość występowania przerzutów do pachowych węzłów chłonnych były istotnie wyższe w populacji chorych młodych
 - b. niekorzystne parametry histologiczne takie jak wysoki stopień złośliwości oraz jego składowe takie jak: liczba mitoz, tworzenie cewek, atypia komórkowa a także inwazja naczyń były znamienne częściej stwierdzane w populacji młodych chorych
 - c. w populacji chorych w wieku <35 lat obserwowano znamienne częstsze występowanie powszechnie uznanych czynników prognostycznych takich jak wysoki indeks proliferacyjny czy fenotyp potrójnie ujemny
 - d. stwierdzono również znamienne częstsze występowanie potencjalnie niekorzystnych czynników prognostycznych takich jak niska ekspresja BRCA1, E-kadheryny, czy wysoka ekspresja białka p53 oraz cytokeratyny 14
2. Zdefiniowano wartość potencjalnych czynników prognostycznych w populacji młodych chorych na raka piersi w odniesieniu do czasu całkowitego przeżycia
 - a. obecność przerzutów w pachowych węzłach chłonnych była istotnym, niekorzystnym czynnikiem prognostycznym
 - b. przeżycie chorych na raka piersi z wysoką atypią komórkową niezależnie od stopnia złośliwości histologicznej było znamienne krótsze w porównaniu do chorych z pośrednią atypią
 - c. parametry takie jak wysoki indeks proliferacyjny, ekspresja receptorów estrogenowych i HER2, fenotyp potrójnie ujemny posiadające wartość prognostyczną w ogólnej populacji chorych na raka piersi, w populacji młodych chorych nie wykazały wartości rokowniczej

8. STRESZCZENIE

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce. Ryzyko zachorowania na ten nowotwór zwiększa się wraz z wiekiem. U młodych kobiet do 35 roku życia wykrywany jest on rzadko i stanowi 2-5 % wszystkich rozpoznawanych raków piersi. Ze względu na gorsze rokowanie i krótszy czas przeżycia całkowitego w tej grupie wiekowej szczególnie istotne jest określenie czynników prognostycznych i predykcyjnych, które umożliwią przewidywanie przebiegu choroby oraz pozwolą na optymalizację leczenia uzupełniającego. Onkolodzy w swojej praktyce klinicznej posługują się wieloma czynnikami prognostycznymi i predykcyjnymi o uznanej wartości w ogólnej populacji chorych na raka piersi, które mogą nie być odpowiednie dla populacji bardzo młodych (<35 lat) chorych. Celem pracy było porównanie występowania określonych klinicznych, patologicznych i molekularnych czynników prognostycznych w populacji młodych i starszych chorych na raka piersi, a także analiza wartości rokowniczej poszczególnych zdefiniowanych czynników prognostycznych w odniesieniu do czasu przeżycia całkowitego młodych chorych.

Materiał i metoda

Przedmiotem badań były tkanki pochodzące z zabiegów operacyjnych 185 kobiet leczonych w Wielkopolskim Centrum Onkologii z powodu wczesnego raka piersi. Grupę badaną stanowiło 99 chorych w wieku 19-35 lat (średnia - 30,6) operowanych w latach 2002-2006. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 86 chorych, w wieku 56-62 lata (średnia 58,4) operowanych w 2006 roku, u których w chwili rozpoznania stwierdzono menopauzę. Analizie poddano dane kliniczne oraz parametry histologiczne i immunohistochemiczne. Wszystkie badania mikroskopowe zostały przeprowadzone w Zakładzie Patologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii.

Zmienne ilościowe przedstawiono jako średnią arytmetyczną wraz z odchyleniem standardowym oraz wartościami ekstremalnymi. Zmienne jakościowe dychotomiczne i

kategorialne wyrażono jako liczbę (procent) zaobserwowanych przypadków, a różnice między nimi oceniano za pomocą testu Chi-kwadrat. Do oceny czasu przeżycia całkowitego zastosowano metodę Kaplana-Meiera.

Wyniki:

Najczęściej rozpoznawanym typem nowotworu w obu grupach był rak przewodowy inwazyjny. U młodych chorych istotnie częściej rozpoznawano raki o wysokim stopniu złośliwości charakteryzujące się wyższą atypią i częstszymi mitozami, w których rzadziej stwierdzano obecność cewek. W grupie badanej obserwowano znamienne wyższe miejscowe zaawansowanie procesu nowotworowego zarówno w odniesieniu do wielkości guza (cecha T) jak i liczby zajętych węzłów chłonnych (cecha N). U starszych chorych znamienne rzadziej stwierdzano występowanie niekorzystnych czynników prognostycznych takich jak: inwazja torebki węzła, naczyń chłonnych czy krwionośnych przez komórki raka.

W guzach u młodych kobiet stwierdzano istotnie rzadszą ekspresję receptora estrogenowego, natomiast ekspresja receptora progesteronowego i HER2 nie różniła się znamienne w porównaniu do chorych starszych.

Fenotyp potrójnie ujemny, który stanowi niekorzystny czynnik prognostyczny stwierdzano istotnie częściej u młodych chorych. W tej grupie wiekowej odnotowano także wyższą dynamikę proliferacji, określaną na podstawie ekspresji białka Ki-67.

Potencjalne niekorzystne czynniki prognostyczne takie jak niska ekspresja BRCA1 i E-kadheryny, czy wysoka ekspresja cytokeratyn 5/6 i 14 oraz EGFR stwierdzano znamienne częściej w populacji młodych chorych.

Odnotowano istotne różnice w czasie przeżycia całkowitego młodych chorych w zależności od stanu pachowych węzłów chłonnych. Chore bez przerzutów do węzłów żyły dłużej.

Innym parametrem o wartości predykcyjnej było występowanie atypii komórkowej – wysoka atypia związana była ze znamienne skróconym czasem przeżycia całkowitego. Pozostałe

klasyczne i potencjalne czynniki prognostyczne nie miały wartości rokowniczej w odniesieniu do czasu całkowitego przeżycia chorych w grupie badanej.

Wnioski:

W wykonanych badaniach stwierdzono istotne różnice w zakresie klinicznych, histologicznych oraz molekularnych cech raków piersi pomiędzy populacjami chorych młodych (<35 roku życia) i starszych (>56 roku życia). U młodych chorych stwierdzono częstsze występowanie niekorzystnych czynników prognostycznych. W oparciu o analizy czasu całkowitego przeżycia zdefiniowano nowe, potencjalnie niekorzystne czynniki rokownicze w populacji młodych chorych na raka piersi.

8. ABSTRACT

Breast cancer is the most common malignancy among Polish women. Morbidity rises with age. In young women (aged below 35 years) the incidence of this malignancy is relatively low, and consists of 2-5% of all breast cancer cases.

Due to worse prognosis and shorter survival in young breast cancer patients it is crucial to determine prognostic and predictive markers to optimise adjuvant therapy. There are a lot of such markers used in everyday oncology-practice, which are acknowledged for general breast cancer population. However, these markers might not be suitable for younger patients (<35 year-old).

The aim of this study was to compare the incidence of defined clinical, pathological and molecular prognostic factors between young and older women diagnosed with breast cancer. Analysis of prognostic value of each potential prognostic factor in the population of young breast cancer patients has been carried out.

Material and methods: Paraffin-embedded tissues of 185 consecutive women diagnosed with early breast cancer in Greater Poland Cancer Center were analysed. The studied group consisted of 99 patients aged 19-35 years (mean age 30,6) who underwent surgery in years 2002-2006. The control group consisted of 86 postmenopausal women, aged 56-62 years (mean age 58,4). Histological and immunohistochemical parameters were assessed. All microscopic studies were conducted in Pathology Department of Greater Poland Cancer Center. Statistical analysis was done using Chi-square test. Survival analysis were presented as Kaplan-Meier curves.

Results: In both groups invasive ductal carcinoma was most the common type of breast cancer. Young women were often diagnosed with high grade tumors, characterised by higher cellular atypia and mitotic rate and absence of tube formation.

Significantly bigger tumors (T) and higher incidence of lymph node metastases (N) was found in the studied group. In the control group unfavourable negative prognostic factors such as

invasion of lymph node capsule or invasion of blood/lymphatic were observed significantly less frequently. Estrogen receptor expression was lower in young women, but expression of progesterone receptor and HER2 were comparable in both groups. Triple negative phenotype, which is an unfavourable prognostic factor, was found more often in young women. In this group higher breast cancer proliferation rate (high Ki-67 expression) was also noted. Among young women other potentially negative factors were also more often detected: low BRCA1 and E-cadherin expression; cytokeratine 5/6 and 14 or EGFR high expression. In young patients the overall survival time significantly correlated with axillary lymph nodes status. Cellular atypia turned out to represent another significant prognostic marker: high rate of cellular polymorphism was related to significantly shorter survival. Other classical and potential prognostic markers did not prove their value in the population of young breast cancer patients.

Conclusions: Significant differences in clinical, histological and molecular features of breast cancers were found between young (<35 years) and older (>56 years) female patients.

Unfavourable prognostic factors were more frequently detected in younger patients. Based on survival analysis, new potentially unfavourable prognostic such as high atypia or low BRCA1 expression were defined in the population of young breast cancer patients.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Krajowa Baza Danych Nowotworowych, Zakład Epidemiologii i Prewencji
Nowotworów Centrum Onkologii- Instytut Warszawa; Raporty na podstawie danych
Centrum Onkologii w latach 2006-2008. www.onkologia.org.pl
2. Ries L, Harkins D, Krapcho M, i wsp.: SEER Cancer Statistics Review 1975-2003.
Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2005
3. Kothari AS, Fentiman IS.: Breast cancer in young women. *Int. J. Clin. Pract.* 2002;
56(3): 184-187
4. Carmichael AR, Bates T.: Obesity and breast cancer: a review of the literature. *Breast*
2004; 13(2): 85-92
5. Pollan M.: Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat.*
2010;123: 3-6
6. Easton DR, Bishop DT, Ford D, Crockford GP.: Genetic linkage analysis in familial
breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage
Consortium. *Am. J. Hum. Gen.* 1993; 52(4): 678-701
7. Young SR, Pilarski RT, Donenberg T, Shapiro C, Hammond LS i wsp.: The
prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast
cancer. *Cancer* 2009; 9:86
8. Sentis M.: Imaging of young women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*
2010; 123: 11-13
9. Houssami N, Irwing L, Simpson JM, McKessar M, Blome S, ii wsp.: Sydney breast
imaging accuracy study: comparative sensitivity and specificity of mammography and
sonography in young women with symptoms. *AJR Am. J. Roentgenol.* 2003; 180(4):
935-940

10. Kreige M, Brekelmans CT, Obdeijn IM, Boetes C, Zonderland HM, i wsp.: Factors affecting sensitivity and specificity of screening mammography and MRI in women with an inherited risk for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100(1):109-119
11. Andreu FJ.: Histologic diagnosis in young women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 123: 15-18
12. Cantin J, Scarth H, Levine M, Hugi M.: Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: 13. Sentinel lymph node biopsy. 2001; 165(2): 166-173
13. Zurrída S, Veronesi U.: A new TNM classification for breast cancer to meet the demands of present and the challenges of the future. *Womans Health (lond Engl.)* 2011; 7(1): 41-9
14. Goldhirsh A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, i wsp.: Kryteria progowe dla wyboru terapii: główne zagadnienia Konsensusu Międzynarodowych Ekspertów z St. Gallen dyskutowane podczas Konferencji Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. *Annals of Oncology* 2009 Reprint
15. Gao F, Carter G, Tseng G, Chivukula M.: Clinical importance of histologic grading of lobular carcinoma in situ in breast core needle biopsy specimens: current issues and controversies. *Am J Clin Pathol* 2010;133(5):767-771
16. Travassoli FA, Devilee P.: World Health Organization of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs.2003; IARC Press, Lyon
17. Elston CW, Ellis IO.: Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19: 403-410
18. Sorlie T, Tibishitani R, Parker J. i wsp.: Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS* 2003; 100: 8418-8423

19. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jaffrey SS, et al.: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(6797): 747-752
20. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, et al.: Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res* 2004; 10(16): 5367-5374
21. Haffy BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins S.A. et al.: Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24(36): 5652-5657
22. Winchester DP, Osteen RT, Menck HR.: The national cancer data base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age. *Cancer J* 1996; 78(8): 1838-1843
23. Gajdos C, Tartter P, Bleiweiss I, Bodian C, Brower S.: Stage 0 to stage III breast cancer in young women. *J Am Coll Surg* 2000; 190(5): 509-515
24. Foxcroft LM, Evans EB, Porter AJ.: The diagnosis of breast cancer in women younger than 40. *Breast* 2004; 13(4): 297-306
25. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ.: The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 1996; 77(11): 2318-2324
26. Maru D, Middleton LP, Wang S, Valero V, Sahin A.: HER-2/*neu* and p53 overexpression as biomarkers of breast carcinoma in women age 30 years and younger. *Cancer J* 2005; 103(5): 900-905
27. Choi DH, KIM S, Rimm DL, Carter D, Haffty BG: Immunohistochemical biomarkers in patients with early-onset breast carcinoma by tissue microarray. *Cancer J* 2005; 11(5): 404-411
28. Domagała W.: Klasyczne i nowe czynniki prognostyczne i predykcyjne w raku sutka u kobiet. *Nowotwory* 1996; 46: 669-690

29. Hayes DF.: Prognostic and predictive factors revisited. *The Breast* 2005; 14: 493-499
30. Rosen PP, Groshen S.: Factors influencing survival and prognosis in early breast carcinoma (T1N0M0-T1N1M0). Assessment of 644 patients with median follow-up of 18 years. *Sur Clin North Am* 1990; 70:937-962.
31. Adair F, Berg J, Joubert L, i wsp.: Long- term follow up of breast cancer patients: the 30-year raport. *Cancer* 1979; 33: 1145-1150.
32. Knight WA, Livingston RB, Gregory EJ i wsp.: Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1977; 37: 4669-4671
33. Hayes DF, Isaacs C, Stearns V.: prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *J.Mammary Gland Biol Neopl* 2001; 6: 375-392
34. Winer E, Treatment of postmenopausal women with hormone responsive breast cancer. *Breast* 2009; 18 (Suppl 1); S16.
35. Dowsett M, Procter M, McCaskill-Stevens W, de Azambuja E, Dafni U i wsp.: Disease-free survival according to degree of HER2 amplification for patients treated with adjuvant chemotherapy with or without 1 year of trastuzumab: the HERA Trial. *J Clin Oncol.* 2009;27(18):2962-9.
36. Wiesner FG, Magener A, Fasching PA, Wesse J, Bani MR i wsp.: Ki-67 as a prognostic molecular marker in routine clinical use in breast cancer patients. *The Breast* 2009; 18:135-141
37. Spyrtos F, Ferrero-Pous M, Trassard M, Hacene K, i wsp.: Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications. *Cancer* 2002; 94: 2151-2159
38. Trihia H, Murray S, Price K, Gelber RD, i wsp.: Ki-67 expression in breast carcinoma: its assotiation with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors- a surrogate marker? *Cancer* 2003; 97: 1321-11331

39. Gasco M, Shami S, Crook T.: The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002; 4:70-76
40. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Bruzzi A, i wsp.: Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki-67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 1106-1112
41. Pieńkowski T.: Znaczenie ekspresji receptora HER2, białek p53, bcl-2, bax, stopnia proliferacji i zawartości receptorów dla estrogenów i progestagenów jako czynników prognostycznych i predykcyjnych u chorych na raka piersi. *Nowotwory Journal of Oncology* 2002; 52(suppl.1).
42. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG.: E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res* 2003; 5: R217-R222.
43. Mauro L, Pellegrino M, Lappano R, Vivacqua A, Giordano F i wsp.: E-cadherin mediates the aggregation of breast cancer cells induced by tamoxifen and epidermal growth factor. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121: 79-89
44. Rakha E, Ellis I.: Are triple-negative and basal-like breast cancer synonymus? *Clinical Cancer Res* 2008; 14: 618 Published on line January 15, 2008
45. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Clarke M, Coates AS, Darby SC, Davies C, Gelber RD, Godwin J, Goldhirsch A i wsp.: Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2008; 5; 371(9606):4-5
46. Speirs V, Malone C, Walton DS i wsp.: Increased expression of estrogen receptor β mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 529-532
47. Zabicki K, Colbert JA, Dominguez FJ, Gadd MA, Hughes KS i wsp.: Breast cancer diagnosis in women ≤ 40 versus 50 to 60 years: Increasing size and stage disparity

- compared with older women over time. *Annals of Surgical Oncology* 2006; 13(8): 1072-1077
48. De La Rochefordiere A, Asselain B, Campana F, Scholl SM, Fenton J i wsp.: Age as prognostic factor in premenopausal breast carcinoma. *The Lancet* 1993; 341:1039-1043
49. Querzoli P, Albonico G, Grazia di Iasio M, Ferreti S, Rinaldi R i wsp: Biophenotypes and survival of BRCA1 TP 53 deleted breast cancer in young women. *Breast Cancer Research et Treatment* 2001; 66: 135-142.
50. Maggard M, O'Connell J, Lane K, Liu J i wsp.: Do young breast cancer patients have worse outcomes? *Journal of Surgical Res* 2003; 113: 109-113
51. Kroman N, Holtveg H, Wohlfahrt J, Jensen MB, Mouridsen HAT i wsp.: Effect of breast-conserving therapy versus radical mastectomy on prognosis for young women with breast carcinoma. *Cancer* 2004;100(4):688-93.
52. Sidoni A, Cavaliere A, Bellezza G, Scheibel M, Bucciarelli E.: Breast cancer in young women: clinicopathological features and biological specificity. *The Breast* 2003; 12, 247-250
53. Lee WY, Jin YT, Chang TW, Lin PW, Su IJ.: Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. *Histopathology* 1999; 34: 106-112
54. Viale G, Giobbie-Hurder A, Gusterson BA, Maiorano E i wsp.: Adverse prognostic value of peritumoral invasion: is it abrogated by adequate by endocrine adjuvant therapy? Result from two International Breast Cancer Study Group randomized trials of chemoendocrine adjuvant therapy for early breast cancer. *Annals of Oncology* 2010; 21: 245-254

55. Mauro L, Pellegrino M, Lappano R, Vivacqua A, Giordano F i wsp.: E-cadherin mediates the aggregation of breast cancer cells induced by tamoxifen and epidermal growth factor. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121: 79-89
56. McCredie MR, Dite GS, Southey MC, Venter DJ, Giles GG i wsp.: Risk factors for breast cancer in young women by oestrogen receptor and progesterone receptor status. *Br J Cancer* 2003; 3; 89(9): 1661-3
57. Cuzick J, Ambroisine L, Davidson N, Jakesz R i wsp.: Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor-positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomised adjuvant trials. LHRH-agonists in Early Breast Cancer Overview group. *Lancet* 2007;369(9574):1711-23.
58. Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C. i wsp.: Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. *Ann Oncol* 2002; 13: 273-279
59. Bertheau P, Steinberg SM, Merino MJ.: C-erbB-2, p53 and nm23 gene product expression in breast cancer in young woman: immunohistochemical analysis and clinicopathologic correlation. *Hum Pathol* 1998; 29(4):323-329
60. Jimor S, Al-Sayer AL, Heys SD. i wsp.: Breast cancer in women aged 35 and under: prognostic and survival. *J R Coll Sur* 2002; 47(5):693-699
61. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F i wsp.: How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer* 2008;123:236-240
62. de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JPJ, van Engeland M, Tjan-HeijnenVC.: Characteristic of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137(2): 183-192

63. Reis-Filho JS, Tutt ANJ.: Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52: 108-118.
64. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Arima N.: Clinical significance of Ki-67 in neoadjuvant chemotherapy for primary breast cancer as a predictor for chemosensitivity and for prognosis. *Breast Cancer* 2010;17(4):269-75
65. Lambie H, Miremadi A, Pinder SE, Bell JA, Paish EC i wsp.: Prognostic significance of BRCA 1 expression in sporadic breast carcinomas. *J Pathol* 2003; 200: 207-213
66. Wilson CA, Payton MN, Elliot GS i wsp.: Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of BRCA1. *Oncogene* 1997; 15: 143-157
67. Rakha E, El-Sheikh E, Kandil MA, El-Sayed ME, Green AR i wsp.: Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Human pathology* 2008; 39:857-865
68. Welch PL, Lee MK, Gonzalez-Hernandez RM, Black DJ, Mahadevappa M i wsp.: BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *PNAS* 2002; 99(11): 7560-7565
69. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG.: E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res* 2003; 5: R217-R222.
70. Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD i wsp.: Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res* 2006; 12(8): 2468-2475
71. Rakha E, Ellis I.: Are triple-negative and basal-like breast cancer synonymus? *Clinical Cancer Res* 2008; 14: 618-622
72. Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wülfing P i wsp.: 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):451-457.
73. Balfe PJ, McCann AH, Welh HM, Kerin MJ.: Estrogen receptor β and breast cancer. *J Cancer Sur* 2004; 30: 1034-1050.
74. Ikeda K, Inoue S.: Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Arch. Histol. Cytol.* 2004; 67(5): 435-442
75. Murphy LC, Watson PH.: Is oestrogen receptor β predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer? *Endocrine- Related Cancer* 2006; 13: 327-334
76. Zhou P, Recht A.: 334Young age and outcome for women with early invasive breast carcinoma. *Cancer.* 2004;101(6):1264-74.
77. Livi L, Meattini I, Saieva C, Borghesi S, Scotti V. i wsp.: The impact of young age on breast cancer outcome. *Eur J Surg Oncol.*2010 Jun 5.
78. Love RR, Duc NB, Dinh NV, Quy TT, Xin Y, Havighurst TC.: Young age as an adverse prognostic factor in premenopausal women with operable breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2002;2(4):294-8.
79. Carter CL, Allen C, Henson DE.: Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63(1):181-7.
80. Gebauer G, Fehm T, Lang N, Jäger W.: Tumor size, axillary lymph node status and steroid receptor expression in breast cancer: prognostic relevance 5 years after surgery. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;75(2):167-73.
81. Pereira H, Pinder SE, Sibbering DM, Galea MH, Elston CW i wsp.: Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. *Histopathology* 1995; 27(3):219-26

82. Klintman M, Bendahl PO, Grabau D, Lövgren K, Malmström P i wsp.: The prognostic value of Ki67 is dependent on estrogen receptor status and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer. *Mod Pathol.* 2010;23(2):251-9.
83. Colleoni M, Rotmensz N, Peruzzotti G, Maisonneuve P, Orlando L i wsp.: Role of endocrine responsiveness and adjuvant therapy in very young women (below 35 years) with operable breast cancer and node negative disease. *Ann Oncol.* 2006;17(10):1497-1503.
84. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL i wsp.: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987;235(4785):177-82.
85. Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute T, Liu ET i wsp.: c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med.* 1994;330(18):1260-6.
86. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D i wsp.: Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006; 295(21):2492-502.
87. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK i wsp.: Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(15 Pt 1):4429-34.
88. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A i wsp.: Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26(8):1275-81.

89. Chang J, Hilsenbeck SG, Sng JH, Wong J, Ragu GC.: Pathological features and BRCA1 mutation screening in premenopausal breast cancer patients. Clin Cancer Res. 2001; 7(6):1739-42.