

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych - streszczenie

Lek. med. Wojciech Kuncman

**Badania heterogenności  
ognisk pierwotnych i synchronicznych przerzutów  
w raku piersi**

Promotor

Dr hab. n. med. Katarzyna Taran

**Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Katedra Onkologii Zakład Patologii  
Kierownik Katedry Onkologii oraz Zakładu Patologii  
Prof. dr hab. n. med. Radzisław Kordek**



**Łódź 2019**

## **Streszczenie w języku polskim**

Jednym z kluczowych problemów w ochronie zdrowia na świecie jest rak piersi. Każdego roku stwierdza się ponad milion trzysta pięćdziesiąt tysięcy nowych przypadków tego nowotworu i pięćset tysięcy zgonów nim spowodowanych. Jednocześnie zachorowalność na raka piersi z roku na rok rośnie, a w krajach rozwiniętych przeżycia 5, 10 i 15 letnie kształtują się na poziomie 89%, 83% i 78%. Pomimo znacznego postępu w diagnostyce i wprowadzania nowoczesnej terapii osiągnięte wyniki leczenia chorych nadal nie są zadowalające, co wskazuje na konieczność poszukiwania nowych czynników predykcyjnych i rokowniczych.

Heterogenność raków piersi, jak i jej wpływ na przebieg choroby nowotworowej w indywidualnych przypadkach są zjawiskiem udokumentowanym w literaturze przedmiotu, jednakże badania przerzutów synchronicznych do węzłów chłonnych są bardzo nieliczne, a możliwości wykorzystania dotychczasowych wyników w praktyce klinicznej pozostają nieznane.

Projekt badawczy miał na celu ocenę heterogenności ognisk pierwotnych i synchronicznych przerzutów w raku piersi, a wiodącym celem badania poza aspektem poznawczym było ujawnianie potencjalnych implikacji klinicznych różnic w immunoekspresji badanych białek. Stwierdzenie potencjalnej heterogenności może wpłynąć na wybór miejsca pod względem oznaczeń białek o wartości predykcyjnej w leczeniu.

Wybór przerzutów synchronicznych do nieodległych węzłów chłonnych pachowych, jako przedmiotu badań, pozwolił na ograniczenie wpływu na uzyskiwane wyniki pojawiających się z czasem zmian genetycznych. Użyta metoda badawcza – technika mikromacierzy tkankowych z wykorzystaniem immunohistochemii, ukazuje nie tylko samą obecność białka w strukturze poszczególnej komórki, ale także jego funkcjonalność biologiczną uwzględniającą również modyfikacje potranskrypcyjne, a ponadto umożliwia jednoczasową ewaluację wielu białek z zachowaniem wiarygodności uzyskiwanych wyników.

Dotychczasowe badania skupiały się głównie na złożoności biologii raka piersi oraz na heterogenności przerzutów pod względem ekspresji podstawowych markerów ER, PR, Ki-67 i HER2, których wyniki często były niejednoznaczne. Doprowadziło to do obecnego doboru ewaluowanych białek, który w prezentowanej pracy objął nie tylko uznane czynniki prognostyczne i predykcyjne w raku piersi, ale

także i inne grupy markerów o potwierdzonym związku z fundamentalnymi mechanizmami rozwoju choroby nowotworowej, ze szczególnym uwzględnieniem przerzutowania. Prezentowana praca jest kompleksową oceną ekspresji wybranych białek o przeważającej funkcji proliferacyjnej (ER, PR, Ki-67, HER2, Bcl-2, Cyklina D1), białek związanych z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym (E-kadheryyna, SLUG i SNAIL) oraz białek potencjalnie wpływających na proces przerzutowania i przebieg choroby nowotworowej, w tym poprzez oddziaływanie z układem odpornościowym (GCDFP-15, PD-L1, PRL-3) w ogniskach pierwotnych i synchronicznych przerzutach w raku piersi.

Na podstawie zgody Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi Nr RNN/12/16/KE z dnia 19 stycznia 2016, przeprowadzono badania immunoekspresji 11 białek (ER, PR, HER2, Ki-67, Bcl-2, Cykliny D1, E-kadheryny, SNAIL i SLUG, GCDFP-15, PDL-1 oraz PRL-3) z wykorzystaniem mikromacierzy tkankowych, w materiałach z guzów pierwotnych oraz synchronicznych przerzutów w pachowych węzłach chłonnych, pozyskanych od 67 pacjentek z rakiem piersi.

W toku przeprowadzonej ewaluacji ujawniono znamienne statystycznie zależności pomiędzy ekspresją uznanych białek o znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym - PR, ER, a także SLUG i SNAIL oraz E-kadheryny związanych z przejściem nabłonkowo – mezenchymalnym w ogniskach pierwotnych i synchronicznych przerzutach w węzłach chłonnych pachowych w raku piersi, a ponadto zaobserwowano dwadzieścia korelacji pomiędzy badanymi parametrami, w tym 3 w obrębie guzów pierwotnych, 11 pomiędzy ogniskami pierwotnymi a wtórnymi oraz 6 w przerzutach.

Wynioskowano, że zróżnicowanie ekspresji ewaluowanych białek w badanych lokalizacjach obejmuje zarówno liczbę komórek wykazujących odczyn dodatni (jej wzrost lub spadek, w tym całkowite zanikanie lub pojawianie się ekspresji „de novo”), jak i siłę zmian. Ogniska pierwotne i synchroniczne przerzuty do węzłów chłonnych pachowych w raku piersi okazała się charakteryzować heterogenność dotycząca nie tylko uznanych białek o znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym, ale także związanych z przejściem nabłonkowo – mezenchymalnym. Zrozumienie tego zjawiska w kontekście wskazywanych w literaturze jego potencjalnych przyczyn, tj.: ewolucji molekularnej guza, selekcji klonalnej lub wpływu mikrośrodowiska

nowotworu wymaga pogłębienia badań, w pierwszym rzędzie porównania z oceną na poziomie mRNA lub z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji.

Wniesiono, że związki pomiędzy ekspresją badanych białek w guzach pierwotnych i synchronicznych przerzutach w raku piersi są złożone i obejmują większość ewaluowanych białek oraz że ujawnione korelacje nie są w pełni tożsame w badanych lokalizacjach. Wysznuo także przypuszczenie, że obraz korelacji wydaje się przede wszystkim oddawać aktywną równowagę procesów proliferacji i przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego oraz wzajemne oddziaływanie czynników proliferacyjnych.

Zasugerowano, że heterogenność w zakresie uznanych czynników o znaczeniu predykcyjnym potencjalnie może wpływać na proces leczenia chorych z rakiem piersi, wdrażanego obecnie na podstawie ewaluacji jedynie pierwotnej zmiany. Natomiast heterogenność obejmująca białka związane z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym podkreśla rolę tego mechanizmu w rozprzestrzenianiu się raka piersi i jej pełne zrozumienie może przyczynić się do obniżenia śmiertelności, której główną przyczyną jest powstawanie ognisk wtórnych.

Wyniki przeprowadzonych badań heterogenności zmian pierwotnych i przerzutowych w raku piersi mogą stanowić argument za potrzebą dalszej personalizacji leczenia chorych, a ocena przerzutów synchronicznych w węzłach chłonnych pachowych wydaje się być cennym uzupełnieniem ewaluacji ogniska pierwotnego o potencjalnych implikacjach klinicznych.

## **Streszczenie w języku angielskim – *abstract***

### **Studies on heterogeneity of primary foci and synchronous metastases in breast cancer**

Breast cancer is one of the key health problems in the world. Every year, there are more than one million three hundred and fifty thousand new cases of this cancer and cause five hundred thousand deaths. At the same time, the incidence of this cancer is increasing every year. In developed countries, the 5, 10 and 15-year survival rate is 89%, 83% and 78%. Despite significant progress in the diagnosis and development of modern therapy, the results of the treatment with breast cancer are still not satisfactory, which indicates the need to search for new predictive and prognostic factors.

The heterogeneity of breast cancers, as well as its effect on the course of the disease in individual cases is well documented in the literature. However, studies of synchronous metastases to lymph node are very rare, and the possibilities of the use of existing results in clinical practice remain unknown.

Presented research aimed to assess the heterogeneity of primary foci and synchronous metastases in breast cancer, and the main goal of the study, apart from the cognitive aspect, was to reveal the potential clinical implications of differences in the immuno-expression of the studied proteins. Finding potential heterogeneity may influence the choice of localization of tissue collection used to detection of prognostic proteins.

The choice of synchronous metastases to axillary lymph nodes, as a subject of the studies allows to limit the influence of the genetic changes occurring over time on the test results. The research method - Tissue Microarray with immunohistochemistry, shows not only the presence of the examined protein in the cell structure, but also its biological functionality, including post-transcriptional modifications, as well as allows for the simultaneous evaluation of many proteins with the highest reliability of the obtained results.

Previous researches have focused mainly on the complexity of breast cancer biology and the heterogeneity of metastases in immunoexpression of the basic markers: ER, PR, Ki-67 and HER2, the results of which have often been questionable. This led to

the current study selection of evaluated proteins, which included not only the established prognostic and predictive factors in breast cancer, but also other groups of markers with a confirmed relationship with the fundamental mechanisms of cancer development, with particular emphasis on metastasizing and the role of the immune system in this process. Presented evaluation is a comprehensive assessment of the expression of selected proteins with predominantly proliferative function (ER, PR, Ki-67, HER2, Bcl-2, Cyclin D1), proteins associated with epithelial-mesenchymal transition (E-cadherin, SLUG and SNAIL) and proteins potentially affecting the metastasizing process and the course of cancer disease, including interaction with the immune system (GCDFP-15, PD-L1, PRL-3) in primary foci and synchronous metastases in breast cancer.

Based on the agreement of the Bioethics Committee of the Medical University of Lodz No. RNN / 12/16 / KE of 19 January 2016, the studies of immunoexpression of 11 proteins (ER, PR, HER2, Ki-67, Bcl-2, Cyclin D1, E-cadherin SNAIL and SLUG, GCDFP-15, PDL-1 and PRL-3) were performed with the use of tissue microarrays in primary tumors and synchronous metastases in axillary lymph nodes obtained from 67 patients with breast.

The evaluation revealed statistically significant relationships between the immunoexpression of recognized prognostic and predictive proteins - PR, ER, as well as SLUG and SNAIL and E-cadherin associated with epithelial-mesenchymal transition in primary foci and synchronous metastases in the axillary lymph nodes in breast cancer, and twenty correlations between the examined parameters, including 3 within primary tumors, 11 between primary and secondary foci, and 6 in metastatic lesions.

It was concluded that the diversity of expression of the evaluated proteins includes both, the number of cells showing a positive reaction (its increase or decrease, including complete lost or appearance of "de novo" expression), as well as the strength of the changes. Primary foci and synchronous metastases to axillary lymph nodes in breast cancer have been shown to be characterized by heterogeneity applying not only to recognized proteins with prognostic and predictive significance, but also associated with epithelial-mesenchymal transition. Understanding of this phenomena in the context of molecular evolution of the tumor, clonal selection or the impact of the tumor microenvironment known as potential reasons for heterogeneity

require further research, first of all the mRNA assessment and/or the use of next generation sequencing.

It was argued that the relationships between the expression of the examined proteins in primary foci and synchronous metastases in breast cancer were complex and included most of the evaluated proteins, and that the revealed correlations were not fully clear in the studied locations. It has also been assumed that the correlation seems to primarily reflect the active balance of proliferation processes and epithelial-mesenchymal transition as well as the interaction of proliferative factors.

It has been suggested that heterogeneity in recognized predictive factors could potentially affect the treatment based on evaluation of the primary lesion only of breast cancer patients. However, heterogeneity of proteins associated with epithelial-mesenchymal transition emphasizes the role of metastatic mechanisms in breast cancer development and its understanding can help to reduce mortality, which is mainly caused by the forming of secondary foci.

The obtained results of the research on the heterogeneity of primary and metastatic lesions in breast cancer may constitute an argument for the need of further patients treatment personalization, and the assessment of synchronous metastases in axillary lymph nodes seems to be a valuable supplement to the evaluation of the primary focus with potential clinical implications.