

Rafał Matkowski

**Wartość prognostyczna
ekspresji receptora estrogenowego i produktu genu nm23
w komórkach raka przewodowego piersi
i ich korelacja z wybranymi parametrami klinicznymi**

Rozprawa doktorska

PROMOTOR:

**prof. dr hab. med. Jan Kornafel
Katedra Onkologii
Akademii Medycznej we Wrocławiu**

WROCŁAW, 2002

SPIS TREŚCI

I.	WSTĘP	strona	3
II.	CEL PRACY	strona	27
III.	MATERIAŁ I METODY	strona	30
IV.	WYNIKI	strona	48
V.	DYSKUSJA	strona	81
VI.	WNIOSKI	strona	99
VII.	STRESZCZENIE	strona	101
VIII.	PIŚMIENNICTWO	strona	106
IX.	WYKAZ SKRÓTÓW	strona	115
X.	SPIS TABEL I RYCIN	strona	116

WSTĘP

EPIDEMIOLOGIA

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet zarówno w Polsce, jak i w większości rozwiniętych krajów świata. Nowotwór ten jest bardzo rzadki wśród mężczyzn, stwierdza się u nich około 1 % wszystkich przypadków raka piersi. W Polsce w 1996 r. zarejestrowano 9 681 zachorowań oraz 4 738 zgonów spowodowanych rakiem piersi wśród kobiet, co stanowi odpowiednio 19% ogółu zachorowań i 14,1% zgonów z powodu chorób nowotworowych [135]. Od kilkunastu lat obserwuje się wzrost współczynników zachorowalności i umieralności, głównie po 60 roku życia. Od 1980 r. u młodszych kobiet nastąpiła stabilizacja umieralności.

Rokowanie w raku piersi zależy od stopnia zaawansowania klinicznego w momencie rozpoznania. Przeżycie 5-letnie, w zależności od pierwotnego zaawansowania, przedstawiono w tabeli I:

Tabela I. Przeżycia 5-letnie w zależności od stopnia pierwotnego zaawansowania.

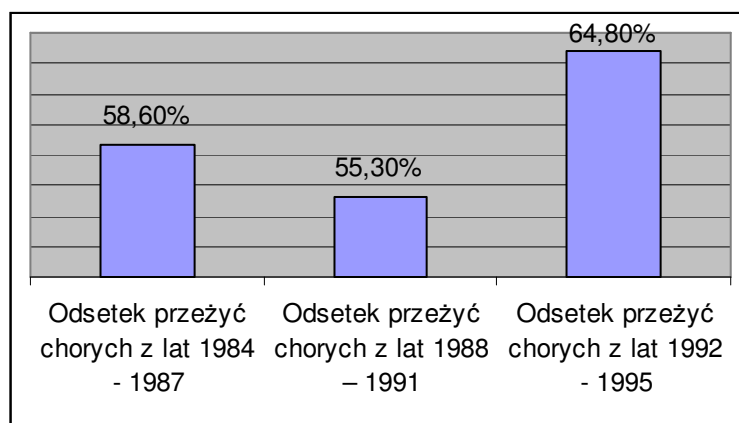
(Na podstawie: Pieńkowski T: Rak piersi, w: Onkologia kliniczna, red. Krzakowski M, Borgis® Wydawnictwo Medyczne, Warszawa 2001, 87-140)

Stopień zaawansowania klinicznego wg UICC	Przeżycia 5-letnie w %
I	90
II	70
III	40
IV	10

Wyniki leczenia raka piersi w Polsce są złe - względne przeżycia 5-letnie chorych w latach 1978-85 wynosiły: 43,9% w Polsce, 58,8% w Estonii, 68,4% w Niemczech, 75,5% w Szwajcarii i 66,5% średnio w Europie. Na szczęście obserwuje się u Polek stopniową poprawę przeżyć 5-letnich. Na rycinie 1 przedstawiono odnotowany na terenie regionu dolnośląskiego odsetek przeżyć 5-letnich w kolejnych czteroletniach lat 1984 – 1995.

Rycina 1. Przeżycia 5-letnie kobiet chorych na raka piersi zamieszkałych na Dolnym Śląsku.

(Na podstawie: Błaszczyk J, Pudelko M: Nowotwory złośliwe w województwie dolnośląskim w roku 1999. Biologica Silesiae, Wrocław 2001)



Jednak w USA, gdzie w 2000 r. wykryto ok. 182 800 nowych zachorowań na raka piersi, a 40 800 osób zmarło z tego powodu, odsetek wyleczeń wynosi (wśród białych mieszkank USA) ponad 80 % [39].

Polska należy do krajów o niskiej zachorowalności na raka piersi. Polskie rejestry nowotworowe obserwują zachorowalność poniżej przeciętnej światowej. Najwyższe współczynniki zachorowalności obserwuje się wśród białych kobiet zamieszkałych w Kalifornii (103,3 – 103,7), na Hawajach (96,5) i Harare w Zimbabwe (127,7). Z kolei najniższe zanotowano w Korei (7,1), Tajlandii (Khon Kaen – 8,4) i w Indiach (Barshi, Paranda i Blum – 8,7).

W tabeli II porównano współczynniki zachorowalności w Polsce i sąsiednich państwach europejskich.

Tabela II. Współczynniki standaryzowane zachorowalności w Polsce i sąsiednich krajach europejskich.

(Na podstawie: Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J: Cancer Incidence in Five Continents. Volume VII, IARC Scientific Publications No. 143, Lyon 1997)

Obszar geograficzny	Kobiety	Mężczyźni
Białoruś	29,6	0,3
Czechy	45,1	0,5
Estonia	36,5	0,5
Finlandia	65,0	0,3
Landy byłej NRD	48,2	0,5
Litwa	33,7	0,4
Norwegia	54,2	0,4
Polska, Kraków	44,0	0,3
Polska, Kielce	25,9	0,4
Polska, Dolny Śląsk	33,4	0,4
Polska, miasto Warszawa	43,2	0,7
Słowacja	38,6	0,5
Szwecja	72,9	0,4
Polska*	35,9	0,5

* Zatoński W, Tyczyński J: Nowotwory złośliwe w Polsce w 1996. Centrum Onkologii – Instytut, Warszawa 1999

W tabeli III porównano współczynniki zachorowalności w krajach wysoko rozwiniętych.

Tabele doskonale ilustrują znacznie większe zagrożenie rakiem piersi w bogatych krajach wysoko rozwiniętych, gdzie współczynniki zachorowalności są dwu lub nawet trzykrotnie wyższe niż w Polsce i innych krajach Europy Środkowo-Wschodniej.

Tabela III. Współczynniki standaryzowane zachorowalności w krajach wysoko rozwiniętych.

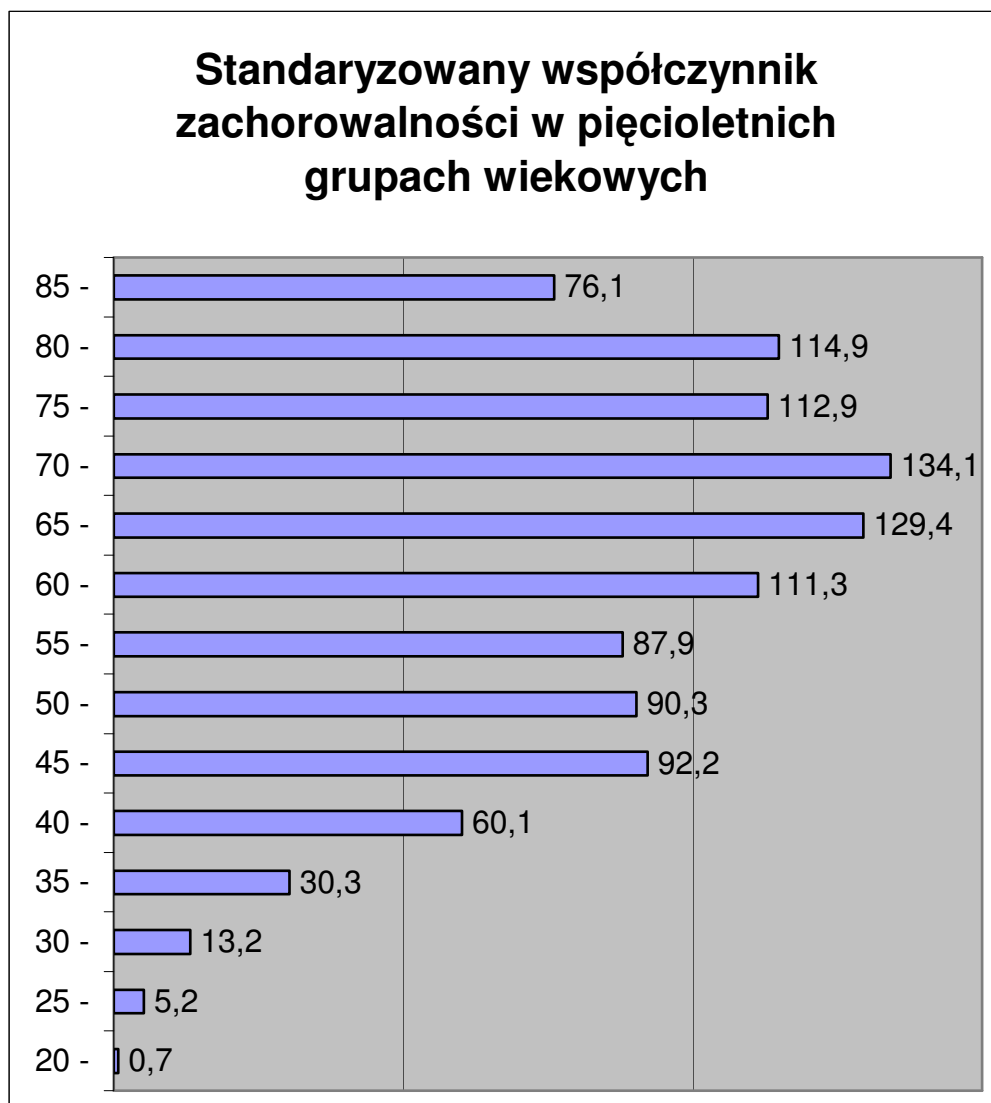
(Na podstawie: Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J: Cancer Incidence in Five Continents. Volume VII, IARC Scientific Publications No. 143, Lyon 1997)

Obszar geograficzny	Kobiety	Mężczyźni
Kanada	76,8	0,6
USA (wg. SEER) populacja biała	90,7	0,7
USA (wg. SEER) populacja czarna	79,3	1,2
Japonia (Hiroshima)	33,4	0,3
Niemcy (Saara)	61,5	0,4
Włochy (Florencja)	67,0	0,6
Francja (Calvados)	76,3	1,1
Szwecja	72,9	0,4
Szwajcaria (Genewa)	77,8	0,6
Wielka Brytania (Wschodnia Anglia)	76,4	0,3

Ryzyko zachorowania na raka piersi wzrasta wraz z wiekiem. Sporadycznie tylko obserwuje się zachorowania przed 20 rokiem życia. Największą liczbę zachorowań obserwuje się u kobiet po 45 roku życia. Na rycinie 2 przedstawiono rozkład zachorowań w poszczególnych grupach wiekowych na terenie Dolnego Śląska.

Rycina 2. Rozkład zachorowań w 5 – letnich grupach wiekowych w latach 1988-1992 na Dolnym Śląsku.

(Na podstawie: Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J: Cancer Incidence in Five Continents. Volume VII, IARC Scientific Publications No. 143, Lyon 1997)



ETIOLOGIA I PROFILAKTYKA

Najważniejszymi czynnikami wpływającymi na ryzyko zachorowania na raka piersi są: wiek oraz przebyty rak sutka podany w wywiadzie przez pacjentkę, jej matkę lub siostrę [16]. Badania zachorowań u emigrantek wykazują, że wpływ czynników środowiskowych na ryzyko zachorowania jest większy niż uwarunkowań genetycznych, jednak u 25 % chorych można stwierdzić obciążenie rodzinne [59, 92]. Około 5-10% przypadków raka piersi ma podłoże dziedziczne. Kobiety z mutacjami genów supresorowych BRCA1 (17q21) i BRCA2 (13q14) mają 56-85% ryzyko zachorowania na raka piersi [25, 118]. W przypadku mutacji BRCA1 - również podwyższone do 16-60% ryzyko raka jajnika (HBOC – *hereditary breast/ovarian cancer*). U 50% nosicielek mutacji genu BRCA1 rak piersi rozwinię się przed 50 rokiem życia, często nawet przed 30. Nosicielki mutacji ww. genów powinny być poddane działaniom profilaktycznym (mogącym obejmować m.in. obustronną mastektomię i owariektomię, terapię tamoksifenem, unikanie antykoncepcji hormonalnej) i diagnostyce zmierzającej do wczesnego wykrycia raka (mammografia od 35 roku życia, ultrasonografia piersi i narządu płciowego od 25 oraz kliniczne badanie piersi od 20 roku życia). Do dziedzicznych postaci raka piersi zalicza się także zespół Li Fraumeni, związany z mutacją genu supresorowego p53 (17p13) oraz zespół Cowdena będący następstwem mutacji genu supresorowego PTEN (10q23). Częściej chorują również nosicielki genu AT (*ataxia teleangiectasia*).

Ekspozycja piersi na promieniowanie jonizujące (badania radiologiczne w profilaktyce gruźlicy, radioterapia w leczeniu trądzika, grzybicy, powiększenia gruczołu sutkowego, połogowego zapalenia sutka i choroby Hodgkina), szczególnie w młodym wieku, związana jest z większym ryzykiem rozwoju raka piersi [55]. Zmniejszenie ilości zbędnych ekspozycji piersi na promieniowanie jonizujące (np. zdjęcia klatki piersiowej) obniża ryzyko rozwoju raka sutka. Uważa się, że około 1 % przypadków raka piersi jest związanych z promieniowaniem stosowanym w medycynie. Jednak np. u kobiet leczonych z powodu choroby Hodgkina przed 16 rokiem życia stwierdza się aż 35 % ryzyko wystąpienia raka piersi w pierwszych czterech dekadach życia [6]. U takich pacjentek należy rozważyć celowość wcześniejszego rozpoczęcia badań mammograficznych w celu wykrycia

wczesnego raka piersi, biorąc jednak pod uwagę ryzyko kumulowania się promieniowania stosowanego w tego typu badaniach.

Alkohol, dieta bogata w tłuszcze, ekspozycja na insektycydy (DDT, PCB), stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych i hormonalnej terapii zastępczej, otyłość w wieku pomenopauzalnym oraz hiperestrogenizm są czynnikami zwiększającymi zagrożenie rakiem piersi. Niektóre łagodne choroby piersi, np. atypowa hiperplazja, dysplazja i rozlana brodawczakowatość również są czynnikami ryzyka raka piersi [18, 78, 127]. Wczesna menarche, późna menopauza oraz późna pierwsza ciąża lub jej brak również zwiększają ryzyko. Z kolei obustronne lub jednostronne usunięcie jajników, późne wystąpienie pierwszego krwawienia miesięcznego, donoszona ciąża (przed 20 rokiem życia), ćwiczenia fizyczne (szczególnie u młodych kobiet), ciężka praca fizyczna zmniejszają prawdopodobieństwo zachorowania na raka sutka [8, 16, 17, 49, 57].

PROFILAKTYKA PIERWOTNA

Tamoksyfen zmniejsza zagrożenie zachorowania na raka piersi u kobiet z podwyższonym ryzykiem rozwinięcia się tej choroby. Redukuje on ryzyko wystąpienia przerzutów lub nawrotu raka piersi i chroni przed rozwojem nowego guza pierwotnego w drugiej piersi u pacjentek po leczeniu przeciwnowotworowym. Pozostałe korzyści wynikające ze stosowania tamoksyfenu, to utrzymanie mineralizacji kośćca u kobiet po menopauzie i redukcja liczby zgonów spowodowanych chorobą niedokrwienną serca. Z drugiej jednak strony tamoksyfen zwiększa ryzyko wystąpienia epizodów zatorowo-zakrzepowych (udar, zakrzepica głębokich naczyń żylnych, zator płucny) oraz raka endometrium, a także powoduje utratę masy kostnej u kobiet przed menopauzą. Biorąc pod uwagę możliwość wystąpienia śmiertelnych powikłań w trakcie leczenia tamoksyfenem decyzja o chemioprewencji powinna być dokładnie rozważona [19, 27, 28, 75, 85, 102].

Aktualnie bada się możliwość stosowania fenretydyny i raloksyfenu jako preparatów o potencjalnym działaniu ochronnym [20, 129]. Raloksyfen zmniejsza ryzyko wystąpienia inwazyjnego raka piersi u kobiet po menopauzie z osteoporozą, jednak lek nie jest pozbawiony działań ubocznych, takich jak

objawy wypadowe, głęboka zakrzepica żylna, zatorowość płucna, obrzęki, działanie diabetogenne. Skuteczność stosowania fenretydyny w chemioprewencji jest obecnie w trakcie badań klinicznych.

Obustronna profilaktyczna mastektomia (zazwyczaj podskórna) zmniejsza ryzyko zgonu z powodu raka piersi u kobiet z rodzinnym obciążeniem tym nowotworem o około 81 – 100 %, pomimo iż po tych zabiegach pozostaje niewielka ilość tkanki gruczołowej. Stosowanie tego typu profilaktyki jest jednak bardzo ograniczone ze względu na okaleczenie, możliwość powikłań pooperacyjnych i aspekt psychologiczny mastektomii [42].

PROFILAKTYKA WTÓRNA

Comiesięczne regularne samobadanie piersi jest najczęściej zalecanym i zarazem najprostszym badaniem mogącym wykryć raka piersi. Niestety, dwa randomizowane badania przeprowadzone w Chinach i w ZSRR wykazały, że samobadanie piersi nie ma wpływu na wykrywalność raka i spowodowaną nim umieralność [109, 120].

Kliniczne badanie piersi może wykazać zmiany nie stwierdzone nawet mammograficznie. Nie przeprowadzono dotychczas randomizowanego badania, oceniającego zastosowanie klinicznego badania piersi w skryningu. W Canadian National Breast Screening Study-2 w losowo podzielonych grupach kobiet w wieku 50-59 lat porównywano wydolność corocznej mammografii, uzupełnionej klinicznym badaniem piersi, w stosunku do klinicznego badania piersi wykonywanego raz w roku. Umieralność w obu porównywanych grupach była po 13 latach podobna [81].

Ultrasonografia jest cennym badaniem uzupełniającym w diagnostyce zmian stwierdzanych innymi metodami w piersiach, jednak nie sprawdza się w roli badania przesiewowego [119]. Rola NMR jako badania przesiewowego nie została dotychczas ustalona.

Przeprowadzono 8 masowych randomizowanych badań przesiewowych (USA, Kanada, Szwecja i Wielka Brytania), w których stosowano mammografię w jednej lub dwóch projekcjach, w odstępach czasu od 12 do 33 miesięcy, u kobiet w różnych grupach wiekowych (obejmując w sumie kobiety w wieku 40-

74 lat). Udowodniono, że badania przesiewowe (polegające na wykonaniu mammografii lub mammografii i fizykalnego badania piersi) redukują umieralność z powodu raka piersi u kobiet w wieku 50-69 lat o ok. 30%. Sugeruje się, że uzupełnienie mammografii klinicznym badaniem piersi może dodatkowo poprawić efektywność skryningu. Ryzyko wyindukowania raka piersi związane z napromienieniem w wyniku corocznej mammografii jest znacznie niższe od spodziewanych korzyści. Nie ma wciąż pewności co do efektywności takiego postępowania u młodszych kobiet (40-49 lat) - czułość mammografii jest u nich niższa, a badanie trudniejsze do interpretacji. Częściej także występują w tej grupie kobiet raki wykrywane pomiędzy poszczególnymi badaniami (tzw. interval cancers) i są one biologicznie bardziej agresywne.

Pomimo istniejących wciąż kontrowersji dotyczących efektywności skryningu w tej grupie wiekowej, American Cancer Society, American College of Radiology oraz National Cancer Institute zalecają jego prowadzenie. Odmienne stanowisko zajęły U. S. Preventive Health Services Task Force oraz American Academy of Family Physicians, które zalecają rutynowe badania mammograficzne w przedziale wiekowym 50 – 69 lat. Nie ma również jasności co do roli skryningu u kobiet po 70 roku życia (pomimo tego rutynowe badania mammograficzne często zalecane są w tej grupie wiekowej np. przez ACS, NCI, ACR). Nie udało się również ustalić optymalnego odstępu pomiędzy kolejnymi badaniami oraz odpowiedzieć na pytanie o zalecaną ilość projekcji (skośna vs. skośna i kranio-kaudalna) [29].

Nie wykazano dotychczas korzyści z wykonywania mammografii u kobiet młodszych niż 39 lat [47]. Obecnie większość ekspertów zaleca wykonywanie corocznej mammografii po 40 roku życia. Dodatkową korzyść w postaci zmniejszenia umieralności o 5-20% można osiągnąć, uzupełniając ją dokładnym badaniem fizykalnym piersi. Rekomendacje American Cancer Society obejmują dodatkowo kliniczne badanie piersi co 3 lata u kobiet w wieku 20-39 lat i corocznie po 40 roku życia oraz samobadanie piersi raz w miesiącu od 20 roku życia.

W Polsce w 2000 roku uruchomiono program wczesnej diagnostyki raka piersi, który miał objąć 147 000 kobiet w wieku 50 – 59 lat [89]. Jego dalsze funkcjonowanie jest jednak zagrożone z powodu niestabilnej sytuacji finansowej, ponadto nie obejmuje on całej populacji. Prócz tego stosowana jest profilaktyka

bierna polegająca na propagowaniu samobadania, okresowym badaniu klinicznym piersi oraz na sporadycznym wykonywaniu badań mammograficznych w przypadku pacjentek objętych obserwacją poradni onkologicznych i ginekologicznych. Tego typu postępowanie (również obejmujące niewielką tylko grupę osób) jest mało efektywne i nie daje oczekiwanych rezultatów. W przeszłości przeprowadzono w Polsce kilka programów badań przesiewowych raka piersi:

- Wronkowski w Warszawie – w 1976 r. przebadano 6 991 kobiet,
- Liszek w Warszawie – 7 520 kobiet (1982 r.),
- Wesołowska w Warszawie – 17 500 kobiet (1993 r., badanie jest kontynuowane),
- Czudowska w Legnicy – 12 500 kobiet (1994 r.),
- Kornafel we Wrocławiu – 15 000 kobiet (1995 r.).

PODZIAŁ HISTOPATOLOGICZNY

Najczęściej używana klasyfikacja raka piersi, [52] wprowadzona przez WHO, dzieli te nowotwory na raki przedinwazyjne (nienaciekające) oraz naciekające:

A. Raki nienaciekające:

- rak wewnątrzprzewodowy,
- rak wewnątrzrzazikowy.

B. Raki naciekające:

- rak przewodowy naciekający,
- rak przewodowy naciekający z przeważającą składową wewnątrzprzewodową,
- rak rzazikowy naciekający,
- rak galaretowaty,
- rak rdzeniasty,
- rak brodawkowaty,
- rak cewkowaty,

- rak gruczołowo-torbielowaty,
- rak wydzielniczy (młodzieńczy),
- rak apokryalny,
- rak z metaplastją (płaskonabłonkową, wrzecionowatokomórkową, chrzęstną i kostną, mieszanego typu,
- inne postacie raka.

C. Choroba Pageta brodawki sutkowej.

W rozpoznaniu różnicowym konieczne jest uwzględnienie nowotworów łagodnych i zmian nienowotworowych oraz rzadko występujących pierwotnych mięsaków i chłoniaków sutka.

Rak przewodowy naciekający (łac. *carcinoma ductale infiltrans*), który jest przedmiotem badań przedstawionych w niniejszej pracy, należy do raków sutka o agresywnym przebiegu i stanowi około 80% wszystkich raków piersi. Jego stopień zróżnicowania określa się najczęściej według skali Blooma-Richardsona. Skala ta uwzględnia następujące parametry oceniane w punktach od 1 do 3:

- tworzenie cewek (wyraźne, umiarkowane i nieznaczne),
- polimorfizm jąder komórkowych (niewielki, umiarkowany, znaczny),
- liczbę figur podziału w 10 polach widzenia (<10, 10-19, >19).

Suma punktów określa jeden z trzech stopni zróżnicowania histologicznego raka przewodowego, który jest uznawany za jeden z ważniejszych czynników rokowniczych:

- I - gdy suma punktów nie przekracza 5,
- II - gdy suma punktów wynosi 6 lub 7,
- III - gdy jest większa niż 7.

STOPNIOWANIE

Określanie stopnia zaawansowania raka piersi pozwala wyróżnić grupy pacjentów o podobnych cechach klinicznych. Obecnie obowiązująca wersja

klasyfikacji TNM z 1997 r. została opracowana wspólnie przez American Joint Committee on Cancer (AJCC) i Union Internationale Contre Cancer (UICC). Stopień zaawansowania oparty jest na ocenie poszczególnych elementów procesu nowotworowego: T – guz pierwotny, N – przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych i M – przerzuty do odległych narządów [21, 113]. Stopień zaawansowania może być określony przedoperacyjnie na podstawie cech klinicznych lub pooperacyjnie przy użyciu kryteriów patologicznych. Stopniowanie zaawansowania klinicznego (TNM lub cTNM), którym posłużył się autor pracy, jest oparte na badaniu przedmiotowym i diagnostyce obrazowej. Stopień zaawansowania patologicznego (pTNM) jest oparty na stopniowaniu klinicznym i histopatologicznym badaniu guza pierwotnego i usuniętych pachowych węzłach chłonnych.

Klasyfikacja TNM

Guz pierwotny (T i pT):

TX: Nie można ocenić guza pierwotnego.

T0: Nie stwierdza się guza pierwotnego.

Tis: Carcinoma in situ: rak przedinwazyjny przewodowy i zrazikowy, choroba Pageta brodawki bez guza w sutku.

Choroba Pageta brodawki z obecnością guza w sutku jest klasyfikowana zgodnie z wielkością guza (cT) lub jego komponenty inwazyjnej (pT).

T1: Guz o największym wymiarze do 2 cm.

T1mic: Mikroinwazja o największym wymiarze do 0,1 cm.

T1a: Guz o największym wymiarze pomiędzy 0,1 a 0,5 cm.

T1b: Guz większy niż 0,5 cm, lecz nie większy niż 1,0 cm.

T1c: Guz większy niż 1,0 cm, lecz nie większy niż 2,0 cm.

T2: Guz większy niż 2,0 cm, lecz nie większy niż 5 cm (w największym wymiarze).

T3: Guz większy niż 5 cm.

T4: Guz każdego wymiaru naciekający (a) ścianę klatki piersiowej lub (b) skórę.

Ścianę klatki piersiowej stanowią żebra, mięśnie międzyżebrowe, mięsień zębaty przedni, lecz nie mięśnie piersiowe.

T4a: Naciek ściany klatki piersiowej.

T4b: Obrzęk skóry (wraz z objawem skórki pomarańczowej) lub owrzodzenie skóry piersi lub guzki satelitarne w skórze piersi.

T4c: Obie możliwości (T4a i T4b)

T4d: Rak zapalny (*carcinoma inflammatorium*).

Rak zapalny charakteryzuje się rozlanym stwardnieniem skóry piersi przypominającym różę, zazwyczaj bez wyczuwalnego w sutku guza. Radiologicznie może być stwierdzony guz i charakterystyczne pogrubienie skóry piersi. Objaw ten spowodowany jest zatorami nowotworowymi skórnych naczyń chłonnych lub nacieczeniem kapilar. Zaciągnięcie skóry lub brodawki sutkowej i inne zmiany skórne z wyjątkiem opisanych jako T4b, c, d mogą występować w stadiach T1, 2, 3 bez wpływu na klasyfikację guza.

Klasyfikacja patologiczna guza pierwotnego (pT) odpowiada klasyfikacji klinicznej (cT). W klinicznej ocenie wielkości guza (cT) bierze się pod uwagę pomiar uzyskany na podstawie badania klinicznego lub mammografii i uznany za najbardziej precyzyjny. Klasyfikacji patologicznej (pT) dokonuje się na podstawie oceny guza pierwotnego wyciętego w granicach tkanek makroskopowo niezmienionych i mierzy się inwazyjny komponent guza (nie bierze się pod uwagę komponentu in situ).

W guzach wieloogniskowych, rozwijających się jednostronnie, do oceny cechy T należy wziąć pod uwagę największe ognisko i zaznaczyć, że guz ma charakter kilkuogniskowy. W przypadku obustronnego raka piersi, oba ogniska stopniowane są oddzielnie.

Okoliczne węzły chłonne – klasyfikacja kliniczna (cN):

NX: Nie można ocenić okolicznych węzłów chłonnych (np. stan po usunięciu węzłów chłonnych).

- N0: Nie stwierdza się przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych.
- N1: Stwierdza się przerzuty do pachowych węzłów chłonnych po stronie zajętego sutka. Węzły chłonne są ruchome.
- N2: Stwierdza się przerzuty do pachowych węzłów chłonnych po stronie zajętego sutka. Węzły chłonne są nieruchome: zrosnięte ze sobą lub z innymi strukturami.
- N3: Stwierdza się przerzuty do zamostkowych węzłów chłonnych po stronie zajętego sutka.

Okoliczne węzły chłonne – klasyfikacja patologiczna (pN):

- pNX: Nie można ocenić okolicznych węzłów chłonnych (nie zostały usunięte, stan po uprzednim usunięciu węzłów chłonnych). Klasyfikacja pN wymaga usunięcia co najmniej dolnych pachowych węzłów chłonnych (tzw. I piętro węzłów pachowych).
- pN0: Nie stwierdza się przerzutów do węzłów chłonnych.
- pN1: Stwierdza się przerzuty do pachowych węzłów chłonnych po stronie zajętego sutka. Węzły chłonne są ruchome.
- pN1a: Tylko mikroprzerzuty (nie większe niż 0.2 cm).
- pN1b: Przerzuty do węzłów większe niż 0.2 cm w największym ognisku.
- pN1bi: Przerzuty w 1-3 węzłach. Największe ognisko mniejsze niż 2 cm i większe niż 0,2 cm w największym wymiarze.
- pN1bii: Przerzuty w 4 lub więcej węzłach chłonnych. Największe ognisko mniejsze niż 2 cm i większe niż 0,2 cm w największym wymiarze.
- pN1biii: Naciek nowotworowy przekracza torebkę węzła chłonnego. Największe ognisko mniejsze niż 2 cm w największym wymiarze.
- pN1biv: Przerzut do węzła chłonnego większy niż 2 cm w największym wymiarze.
- pN2: Stwierdza się przerzuty do pachowych węzłów chłonnych po stronie zajętego sutka. Węzły chłonne są nieruchome: zrosnięte ze sobą lub z innymi strukturami.

pN3: Stwierdza się przerzuty do zamostkowych węzłów chłonnych po stronie zajętego sutka.

Przerzuty odległe (M):

MX: Nie można ocenić obecności przerzutów odległych.

M0: Nie stwierdza się przerzutów odległych.

M1: Stwierdza się przerzuty odległe (w tym również przerzuty w nadobojczykowych węzłach chłonnych po stronie zajętego sutka).

Klasyfikacja patologiczna (pM) przerzutów odległych odpowiada klasyfikacji klinicznej (cM).

W razie wątpliwości dotyczących właściwej kategorii przy ocenie stopnia zaawansowania w klasyfikacji TNM należy przyjąć niższą kategorię.

Tabela IV. Stopnie zaawansowania klinicznego.

Stopień 0	Tis, N0, M0
Stopień I	T1,* N0, M0
Stopień IIA	T0, N1, M0 T1,* N1,** M0 T2, N0, M0
Stopień IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0
Stopień IIIA	T0, N2, M0 T1,* N2, M0 T2, N2, M0 T3, N1, M0 T3, N2, M0
Stopień IIIB	T4, Każde N, M0 Każde T, N3, M0
Stopień IV	Każde T, Każde N, M1

*T1 zawiera T1mic.

**Rokowanie u pacjentów ze stopniem pN1a jest podobne jak u pacjentów z pN0.

OBJAWY RAKA PIERSI

Najczęstszym objawem raka piersi jest guz wyraźnie różniący się od otaczających go tkanek. Rzadziej rak występuje pod postacią nieostro odgraniczzonego zgrubienia lub niewielkiego zagęszczenia tkanek, nieobecnego w drugiej piersi. Niektóre pacjentki zgłaszają się z powodu zmiany kształtu lub powiększenia się sutka. Zmiany te są zazwyczaj niebolesne, co powoduje, że pacjentki zgłaszają się do lekarza z opóźnieniem. Bolesne zmiany zazwyczaj okazują się być torbielami. Jeżeli zostanie stwierdzony w piersi guz, należy dokładnie ocenić jego wielkość, strukturę, lokalizację, spoistość, ruchomość względem skóry, mięśni piersiowych i ściany klatki piersiowej. W wielu przypadkach raka zmianom w sutkach towarzyszy guz lub zgrubienie w okolicy pachowej, rzadziej nadobojczykowej, podobojczykowej lub na szyi. W 1 % przypadków objawem raka sutka jest powiększenie węzłów chłonnych pachowych bez badalnego w piersi guza pierwotnego.

Krwisty lub jasny i lepki wyciek z brodawki sutkowej jest rzadkim objawem raka piersi (2 – 3 %). Krwisty wyciek jest zazwyczaj spowodowany obecnością łagodnego brodawczaka wewnątrzprzewodowego. Istnieje wiele nienowotworowych przyczyn, które mogą powodować wyciek z brodawki sutkowej: choroba włókniasto-torbielowata piersi, zakażenie, stosowanie doustnych środków antykoncepcyjnych, leków uspokajających, zaburzenia hormonalne. Czasami wydzielina pojawia się bez uchwytnej przyczyny.

Sporadycznie rak sutka występuje pod postacią choroby Pageta. Objawami raka Pageta mogą być ból, nadwrażliwość, przebarwienie, krwawienie, swędzenie, pogrubienie i owrzodzenie brodawki sutkowej, egzematyczne i kruche ognisko w jej obrębie. Choroba Pageta zazwyczaj towarzyszy przedinwazyjnemu lub inwazyjnemu rakowi piersi. Rozpoznanie stawia się na podstawie badania histopatologicznego wycinka pobranego z brodawki sutkowej.

Rzadko występującą postacią raka piersi jest rak zapalny (*carcinoma inflammatorium*). Zmiana ta charakteryzuje się rozlanym, rumieniowatym stwardnieniem skóry powiększonej i obrzękniętej piersi, zazwyczaj bez badalnego

palpacyjnie guza w sutku. Radiologicznie może być stwierdzany guz lub zgrubienie skóry piersi. Kliniczne objawy raka zapalnego upodabniają go do różny lub szybko postępującego stanu zapalnego. Zazwyczaj jest to choroba w stadium rozsiewu krwiopochodnego, większość pacjentów ma przerzuty w węzłach chłonnych. Rozpoznanie stawia się w oparciu o wynik badania histopatologicznego wycinka tkanki sutka pobranej wraz z fragmentem skóry.

Do klinicznych cech raka piersi zalicza się ponadto:

- zmiany skórne: rumień, obrzęk, guzki satelitarne, poszerzone żyły o nieregularnym przebiegu,
- zaciągnięcie skóry lub brodawki sutkowej,
- objaw skórki pomarańczy (peau d'orange): tworzenie się dołków w obrzękniętej skórze sutka pod uciskiem palca, samoistne tworzenie się dołeczków w skórze,
- ból piersi.

Wczesny rak piersi zazwyczaj nie powoduje dolegliwości bólowych, często nie stwierdza się również żadnych innych objawów fizykalnych. Wobec coraz szerszego dostępu do badań mammograficznych wykrywa się coraz więcej guzów niewyczuwalnych w badaniu klinicznym, w coraz niżej zaawansowanych stadiach rozwoju. Niestety, również mammografia ma ograniczoną skuteczność – stwierdza się zarówno wyniki fałszywie dodatnie, jak i fałszywie ujemne. Olbrzymią rolę w wykrywaniu wczesnego raka piersi odgrywają również: ultrasonografia, biopsja cienkoigłowa, badanie kliniczne i samobadanie piersi. Rozpoznanie raka piersi stawia się w oparciu o badanie histopatologiczne preparatu uzyskanego drogą biopsji chirurgicznej, mammotomicznej lub w oparciu o badanie cytologiczne rozmazu z cienkoigłowej biopsji aspiracyjnej [70].

ROZPRZESTRZENIANIE SIĘ RAKA PIERSI

Wcześnie wykryty i leczony rak piersi rokuje lepiej, jednak nawet w takim przypadku nie ma gwarancji wyleczenia chorej. Rak piersi jest guzem rosnącym powoli, wielkość 1 cm osiąga po 8 – 20 latach wzrostu. W przypadku niektórych guzów dochodzi do rozsiewu, zanim jeszcze zostało wykryte ognisko pierwotne. Zdarza się, że u pacjentów z bardzo małymi zmianami stwierdza się zajęcie węzłów chłonnych lub przerzuty odległe. Wraz ze wzrostem guza zwiększa się prawdopodobieństwo przerzutów odległych [64, 126]. Niektórzy autorzy sugerują, że rak piersi jest zawsze chorobą rozsianą już w momencie diagnozy. Dla rozwoju raka piersi charakterystyczna jest długotrwałość choroby oraz heterogeny i nieprzewidywalny przebieg. Około 50 % pacjentów po leczeniu żyje bez wznowy i objawów choroby, jednak ryzyko nawrotu i rozsiewu istnieje przez około 20 – 30 lat po terapii przeciwnowotworowej i nie można określić odstępu czasowego, po którym pacjentkę można uznać za zupełnie zabezpieczoną przed nawrotem choroby [54].

Rak piersi rozprzestrzenia się miejscowo, regionalnie oraz systemowo. Patologicznie często jest chorobą wieloogniskową, natomiast klinicznie rzadko stwierdza się raka obustronnego lub wieloogniskowego - częściej ma to miejsce w przypadku raka zrazikowego.

Miejscowo rak piersi nacieka okoliczną skórę, mięśnie piersiowe i ścianę klatki piersiowej.

Najczęstszym umiejscowieniem przerzutów raka piersi są pachowe węzły chłonne po zajętej stronie. U około 30 – 40 % pacjentów w momencie rozpoznania stwierdza się przerzuty do pachowych węzłów chłonnych. Aby ocenić ich stan konieczne jest wykonanie limfadenektomii pachowej i badania histopatologicznego preparatu pooperacyjnego. Kliniczna ocena zajęcia węzłów chłonnych jest nieprecyzyjna: błędne oceny - fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne - zdarzają się w 25 – 39 %.

Węzły chłonne piersiowe wewnętrzne są drugą główną lokalizacją przerzutów w układzie chłonnym – szczególnie często węzły te są zmienione

przerzutowo przy lokalizacji raka w kwadrantach wewnętrznych i centralnym sutka, oraz gdy zajęte są węzły chłonne pachowe. Wykrycie przerzutów w węzłach chłonnych zamostkowych jest trudne ze względu na ich lokalizację wewnątrz klatki piersiowej.

Rozsiew krwio pochodny raka piersi może występować niezależnie od obecności przerzutów w układzie chłonnym [65]. Przerzuty odległe najczęściej lokalizują się w kościach (60 %), płucach (10 %), wątrobie (5 %), mózgu (5 %), skórze, tkankach miękkich oraz wielonarządowo (15 – 20 %). Przerzuty mogą być obecne już w momencie rozpoznania, najczęściej jednak występują po okresie wolnym od objawów choroby. U pacjentów z rakiem piersi przerzuty odległe są ostateczną przyczyną śmierci.

W przypadku nawrotu raka piersi, po zastosowaniu odpowiedniego leczenia, w wielu przypadkach można uzyskać długi okres przeżycia. Do nawrotów choroby dochodzi najczęściej w 2 – 3 roku obserwacji i w 1/3 przypadków są to wznowy miejscowe, natomiast w 2/3 przypadków – rozsiew krwio pochodny [72].

LECZENIE

Standardowym sposobem postępowania w raku piersi w II stopniu zaawansowania klinicznego jest leczenie chirurgiczne uzupełnione radioterapią, hormonoterapią lub chemioterapią. O ostatecznym kształcie leczenia decydują czynniki kliniczno-patologiczne, stan ogólny chorej oraz jej zgoda na proponowane postępowanie.

Zasady leczenia stosowane w 1993 i 1994 roku były nieco inne niż obecnie obowiązujące, gdyż ze względu na postęp wiedzy w ostatnich latach obserwuje się tendencję do wykonywania operacji mniej okaleczających. W analizowanej grupie nie było pacjentek leczonych techniką oszczędzającą sutek (BCT – *breast conserving therapy*) polegającej na usunięciu guza

z marginesem tkanek zdrowych, limfadenektomii pachowej i radioterapii pooperacyjnej pozostawionej tkanki gruczołu piersiowego. Kwalifikacja do tego typu leczenia była wówczas bardzo ostrożna i ograniczona do pacjentek w I stopniu zaawansowania klinicznego.

Standardem postępowania terapeutycznego była operacja radykalna wykonana sposobem Patey'a w modyfikacji Maddena lub Auchinclose'a - polegająca na usunięciu guza pierwotnego wraz z gruczołem piersiowym, całej skóry z brodawką i otoczką, powięzi mięśnia piersiowego i pachowych węzłów chłonnych. Z podobnych przyczyn częściej kwalifikowano chore do operacji radykalnej sposobem Halsteda, w której dodatkowo usuwa się mięsień piersiowy większy i mniejszy.

Radioterapię uzupełniającą stosowano w następujących przypadkach:

- radioterapia na obszar regionalnych węzłów chłonnych w przypadku zajęcia przez przerzuty więcej niż trzech węzłów chłonnych pachowych,
- radioterapia na obszar pooperacyjny ściany klatki piersiowej i regionalne węzły chłonne, gdy stwierdzono w preparacie pooperacyjnym przerzuty w więcej niż 3 węzłach chłonnych oraz guz większy niż 2 cm lub cechy świadczące o zwiększonym ryzyku wznowy miejscowej czy nieradykalności operacji.

Wskazaniami do uzupełniającego leczenia systemowego były:

- histopatologicznie stwierdzone przerzuty do węzłów chłonnych, nawet jeżeli obecne były w jednym tylko węźle,
- czynniki pogarszające rokowanie u pacjentek bez przerzutów do węzłów chłonnych.

Leczenia uzupełniającego nie proponowano chorym bez przerzutów do węzłów chłonnych potwierdzonych w badaniu histologicznym, gdy guz pierwotny był mniejszy niż 1 cm w największym wymiarze, a także w stopniu histologicznego zróżnicowania B I, lub gdy guz miał utkanie raka brodawkowatego albo cewkowatego. Ponieważ w latach 1993 i 1994 nie oznaczano standardowo w DCO receptorów estrogenowych ani

progesteronowych, w leczeniu systemowym stosowano chemioterapię lub hormonoterapię tamoksyfenem, w zależności od stanu hormonalnego, wyniku badania histopatologicznego, wieku, stanu ogólnego pacjentek oraz przeciwwskazań internistycznych.

W przypadku niepomyślnego przebiegu choroby – pojawienia się wznowy miejscowej lub rozsiewu – stosowano indywidualnie dobrane metody postępowania: leczenie chirurgiczne, chemioterapię i hormonoterapię oraz terapię objawową i paliatywną.

CZYNNIKI ROKOWNICZE

Niespełnionym dotychczas marzeniem każdego onkologa jest, aby leczenie przeciwnowotworowe mogło być indywidualnie ukierunkowane przeciwko konkretnemu guzowi. Staje się ono coraz bliższe spełnienia dzięki licznym wskaźnikom biologicznym, patologicznym i coraz częściej – molekularnym.

Czynniki prognostyczne definiujemy jako wskaźniki biologiczne bądź kliniczne, które są bezpośrednio związane z całkowitym lub wolnym od choroby czasem przeżycia (przy założeniu, że nie stosowano systemowego leczenia uzupełniającego, które modyfikowałoby naturalny przebieg choroby). Należy odróżnić je od czynników predykcyjnych, które są wskaźnikami związanymi z prawdopodobieństwem odpowiedzi lub braku odpowiedzi na poszczególne schematy terapii przeciwnowotworowej. Niektóre wskaźniki mogą mieć zarówno wartość prognostyczną, jak i predykcyjną. Przykładem może tu być receptor estrogenowy, którego obecność w guzie piersi związana jest z lepszym rokowaniem i dobrą odpowiedzią na leczenie hormonalne.

Idealny czynnik prognostyczny powinien spełniać następujące wymagania [33]:

- musi być niezależny statystycznie od innych uznanych wskaźników rokowania, a jego wartość prognostyczna musi być znamienna statystycznie;
- metody służące do jego identyfikacji powinny być czułe, specyficzne, niedrogie i powtarzalne;
- powinien być łatwy do interpretacji klinicznej;
- jego użycie w selekcji pacjentów do poszczególnych metod leczenia powinno poprawiać rokowanie w stosunku do podziałów uzyskanych na podstawie klasycznych kryteriów.

Poniżej zebrałem najważniejsze, potencjalnie użyteczne w raku piersi, czynniki prognostyczne [22, 23, 33, 40, 79, 86, 90, 132].

Czynniki kliniczne i patologiczne:

- typ histologiczny guza,
- stan pachowych węzłów chłonnych,
- stopień histologicznej złośliwości,
- rozmiar guza,
- stan hormonalny pacjentki,
- wiek chorej.

Receptory i czynniki wzrostu:

- receptor estrogenowy,
- receptor progesteronowy,
- czynniki regulowane przez estrogeny (pS2, HSP70 - białka szoku cieplnego),
- EGFR (receptor czynnika wzrostu nabłonków),
- onkogen c-erbB-2,
- onkogen H-ras,
- protoonkogen c-myb,
- ILGF (insulino-podobny czynnik wzrostu),
- receptor dla witaminy D.

Markery wyrażające potencjał wzrostu i progresji:

- aktywność kinazy tymidynowej,
- frakcja komórek w fazie S,
- przeciwciało Ki-67,
- przeciwciało MIB-1.

Markery angiogenezy:

- przeciwciało przeciw CD-31,
- przeciwciało przeciw czynnikowi VIII,
- przeciwciało przeciw E-80.

Markery potencjału guza do naciekania i inwazyjności:

- inhibitory aktywatora plazminogenu 1 i 2 (PAI 1 i 2),
- aktywator plazminogenu o typie urokinazy (uPA) i jego receptor (uPAR),
- katepsyna D,
- receptor lamininowy (LR),
- E-kadheryna,
- CD 44,
- Vimentyna.

Geny supresorowe:

- nm23,
- p53,
- p21.

Inne:

- ploidia DNA w cytometrii przepływowej,
- parametry oporności wielolekowej,
- mikroprzerzuty w szpiku kostnym,
- czas operacji względem cyklu miesięczkowego chorej,
- białko związane z Haptoglobina (Hpr).

Poniżej zgrupowałem czynniki predykcyjne dla różnych metod terapeutycznych. Większość z nich jest nadal w fazie badań klinicznych i nie można jeszcze ocenić ich przydatności [22, 23, 33, 40, 79, 86, 90, 132].

Czynniki odpowiedzi na hormonoterapię:

- obecność receptora estrogenowego,
- obecność receptora progesteronowego,
- ekspresja białka pS2,
- brak ekspresji c-erbB-2,
- brak ekspresji EGFR,
- niski potencjał proliferacyjny.

Czynniki przewidujące wrażliwość na chemioterapię:

- brak ekspresji P-glikoproteiny,
- ekspresja białek szoku cieplnego,
- ekspresja c-erbB-2 (HER-2),
- ekspresja EGFR,
- podwyższony poziom topoizomerazy II,
- podwyższona kinetyka komórkowa,
- parametry oporności wielolekowej (MDR).

Niektóre metody leczenia nadal pozostają w fazie eksperymentalnej. Przypuszcza się, że następujące czynniki mogą okazać się dla nich czynnikami predykcyjnymi:

- dla terapii (transfekcji) genowej: ekspresja p53 i ekspresja nm23,
- dla zastosowania przeciwciał lub toksyn przeciwko receptorom: EGFR,
- dla leczenia inhibitorami kolagenazy: uPA, LR, kolagenaza IV i stromelizyna 3
- dla terapii inhibitorami angiogenezy: wewnątrzguzowa neoangiogeneza i czynnik wzrostu fibroblastów.

Przełomem w tej grupie było wprowadzenie do leczenia Trastuzumabu (Herceptyny) – monoklonalnego przeciwciała wiążącego się z receptorem HER-2.

CEL PRACY

M. S. Fox [31] na podstawie analizy doświadczeń związanych z przeżywalnością pacjentów z rakiem piersi sugeruje, że: „Choroba diagnozowana jako rak sutka zawiera w sobie co najmniej dwie samodzielne jednostki, które, jak dotąd, nie są w sposób wiarygodny odróżniane – jedna o szybkim, niekorzystnym przebiegu i druga o rokowaniu niewiele różniącym się od tego, jakie mają kobiety w podobnym wieku bez objawów choroby nowotworowej. Mimo że niemal wszystkie pacjentki z rakiem piersi są leczone, te dotknięte chorobą o niekorzystnym przebiegu charakteryzują się umieralnością nieznacznie tylko odmienną od obserwowanej u nieleczonych chorych w XIX wieku.” Fox sugeruje dalej: „Należy rozważyć, czy choroba uznana za pojedynczą jednostkę, występująca pod nagłówkiem raka piersi, nie reprezentuje dwóch lub więcej stanów różniących się właściwościami biologicznymi. (...) Istnieją niedwuznaczne oznaki istnienia jednostki chorobowej, która według kryteriów histologicznych jest złośliwa, ale biologicznie jest łagodna. (...) Dopóki nie udowodnimy istnienia tej niezłośliwej postaci i nie nauczymy się jej identyfikować, każda zmiana uznana histologicznie za raka musi być leczona, jakby biologicznie była rakiem.”

Wiele dalszych obserwacji potwierdza, że w obrębie II stopnia zaawansowania klinicznego raka piersi znajdują się pacjentki o różnej prognozie i przebiegu klinicznym choroby, a dotychczas stosowane czynniki prognostyczne

nie są w stanie wydzielić grupy o bardzo dobrym rokowaniu, która z całą pewnością nie wymagałaby leczenia uzupełniającego.

Inny aspekt dylematów w wyborze leczenia poruszył P. M. Ravdin [96]: „Część kobiet (...) ma wyjątkowo złe rokowanie pomimo stosowania najlepszego dostępnego obecnie leczenia. Gdybyśmy potrafili zidentyfikować poprzez badanie kombinacji markerów, które z guzów są szczególnie agresywne, u tych chorych można by rozważyć intensywniejsze, bądź doświadczalne metody terapii ...”.

W II stopniu zaawansowania klinicznego leczeniem z wyboru jest chirurgia, jednak niemal wszystkie chore wymagają terapii uzupełniającej w postaci leczenia systemowego (chemioterapii i hormonoterapii) oraz lokoregionalnego (radioterapii). Wskazania co do rodzaju leczenia uzupełniającego opierają się na analizie czynników prognostycznych i predykcyjnych.

Gen nm23 (**nonmetastatic**) zlokalizowany w chromosomie 17q21 koduje białka z grupy nukleozydowych kinaz dwufosforanowych (NDP-K, NDP-kinazy). Białka te mogą być wykrywane w cytoplazmie oraz w jądrach komórek zdrowych i nowotworowych w reakcji immunohistochemicznej z użyciem przeciwciał monoklonalnych. Obserwowano zależność pomiędzy zmniejszoną ekspresją białek z tej grupy, a większą częstością występowania przerzutów, niskim zróżnicowaniem komórek nowotworowych i niską ekspresją receptora estrogenowego w komórkach raka piersi. Nie jest znana zależność pomiędzy ekspresją nm23 a odpowiedzią na leczenie (donoszono o związku niskiej ekspresji z opornością na leczenie cisplatyną). Szeroko dyskutowane są w literaturze związki pomiędzy ekspresją NDP-K a stanem węzłów chłonnych pachowych, rokowaniem i czasem wolnym od choroby nowotworowej. Wyniki badań oscylują od bardzo zachęcających [15-letnie przeżycia u 91% pacjentek bez przerzutów do węzłów chłonnych (N-) z nasiloną ekspresją nm23 (nm23+) w stosunku do 70% chorych N- / nm23-] do podważających znaczenie tego genu jako markera inwazyjnego fenotypu guza nowotworowego.

Receptor estrogenowy (ER) jest powszechnie uznanym niezależnym wskaźnikiem prognostycznym i predykcyjnym, chociaż istnieją prace wskazujące na brak prognostycznej wartości zawartości ER w komórkach raka. Większość badań wskazuje na obecność silnego związku pomiędzy ekspresją ER a czasem całkowitego przeżycia, czasem do wystąpienia przerzutów odległych i wrażliwością raka na hormonoterapię. Sugeruje się, że stan ER raczej odzwierciedla stopień proliferacji guza niż jego zdolność do dawania przerzutów. Receptory te mogą być wykrywane w reakcji immunohistochemicznej z użyciem przeciwciał monoklonalnych.

Zasadniczym celem pracy było zbadanie związków pomiędzy obecnością białka nm23-H1 i receptorów estrogenowych w komórkach raka przewodowego piersi a czasem przeżycia pacjentek oraz okresem wolnym od objawów choroby. Podobnej analizie poddano klasyczne parametry kliniczno-patologiczne. Z tym wiązało się określenie przydatności omawianych markerów i pozostałych analizowanych czynników do oceny prognozy i wyłonienia spośród homogennej grupy pacjentek w II stopniu klinicznego zaawansowania raka piersi podgrup chorych o dobrym i złym rokowaniu.

Kolejnym celem niniejszej pracy była ocena zależności pomiędzy dwoma badanymi markerami oraz parametrami kliniczno-patologicznymi, powszechnie uważanymi za czynniki prognostyczne, jak i tymi, których znaczenie rokownicze nie zostało dotychczas udowodnione.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

W latach 1993 i 1994 w Dolnośląskim Rejestrze Nowotworów, który obejmował swoim zasięgiem ówczesne województwa: wrocławskie, legnickie, wałbrzyskie i jeleniogórskie, zarejestrowano 1401 nowych zachorowań na raka piersi wśród kobiet (719 w 1993 r. + 682 w 1994 r.). Na podstawie księgi głównej szpitala ustalono, że z tej grupy chorych w Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu (dyrektor DCO: dr n. med. Marek Pudełko) na oddziałach chirurgicznych leczono operacyjnie 266 pacjentek w 1993 i 270 pacjentek w 1994 roku. Na podstawie dokumentacji medycznej, odszukanej w rejestracji i archiwum Dolnośląskiego Centrum Onkologii, wyodrębniono homogeną grupę 101 pacjentek leczonych z powodu raka przewodowego piersi o stopniu złośliwości histologicznej II i III wg Blooma-Richardsona w II stopniu zaawansowania klinicznego. W archiwum Zakładu Patomorfologii DCO (kierownik: dr n. med. Andrzej Wojnar) odnaleziono bloczki parafinowe z tkanek guzów pobranych w trakcie zabiegów operacyjnych. Wszystkie badania histopatologiczne wykonywane były w Zakładzie Histopatologii Dolnośląskiego Centrum Onkologii. Każdy preparat oceniany był przez dwóch specjalistów patomorfologów.

Dane kliniczno–patologiczne ustalono na podstawie archiwalnej dokumentacji medycznej. Losy pacjentek ustalono dzięki analizie bieżącej dokumentacji medycznej (Dolnośląskie Centrum Onkologii prowadzi systematyczną kontrolę stanu zdrowia swoich pacjentów w Poradni

Onkologicznej DCO we Wrocławiu), danych z Dolnośląskiego Rejestru Nowotworów i z regionalnych Urzędów Stanu Cywilnego. Pod uwagę brano następujące czynniki kliniczno-patologiczne:

- długość okresu przeżycia (OS) z granicznym czasem obserwacji 5 lat, wyrażony w tygodniach;
- czas do wystąpienia nawrotu choroby nowotworowej (DFS) z granicznym czasem obserwacji 5 lat, wyrażony w tygodniach;
- lokalizacja nawrotu – przerzuty odległe bądź wznowa miejscowa;
- stan regionalnych węzłów chłonnych w badaniu histopatologicznym (obecność lub brak przerzutów nowotworowych);
- stopień złośliwości histologicznej guza wg Blooma-Richardsona (II lub III);
- wielkość guza w milimetrach w badaniu klinicznym;
- stan regionalnych węzłów chłonnych w badaniu klinicznym (N0 lub N1);
- stopień zaawansowania klinicznego (IIa lub IIb);
- stan odżywienia oceniony indeksem masy ciała BMI - stosunek masy ciała w kilogramach do wzrostu pacjentki wyrażonego w metrach podniesionego do kwadratu;
- wiek chorych w latach w momencie rozpoznania;
- stan hormonalny w momencie leczenia (pacjentka przed lub w trakcie menopauzy);
- czas trwania objawów i lokalizację guza pierwotnego;
- czynniki reproduktywne (ilość porodów i poronień, czas trwania okresu miesiączkowania w latach);
- rak sutka i inne nowotwory w przeszłości (w wywiadzie u pacjentki i w jej rodzinie);
- rodzaj zastosowanego leczenia chirurgicznego i uzupełniającego (radioterapia, chemioterapia, hormonoterapia).

Badania immunohistochemiczne wykonywano na preparatach wykonanych z bloczków parafinowych. Serie skrawków grubości 5 μ m parafinowych (pobranych z tych samych bloczków) nanoszone były na szkiełka podstawne super frost plus. W jednej serii oznaczono w komórkach badanego nowotworu ekspresję receptora estrogenowego (ER), w drugiej białko nm23-H1. W każdym przypadku przeprowadzono również kontrolę ujemną.

Badania immunohistochemiczne przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii Akademii Medycznej we Wrocławiu (kierownik: prof. dr hab. Maciej Zabel).

W celu lokalizacji ER i białka nm23-H1 zastosowano następujące zestawy:

- przeciwciała monoklonalne przeciwko receptorowi estrogenowemu - N 1575, Dako, Dania;
- mysie przeciwciała monoklonalne przeciwko ludzkiemu białku nm23-H1, clone:37,6 (Novocastra, Wielka Brytania);
- LSAB2 Kit, K0675, Dako, Dania;
- DAB, S3000, Dako, Dania.

Zastosowano następującą metodykę oznaczeń:

1. Odparafinowanie i uwodnienie badanych preparatów z użyciem ksylenu i szeregu rozcieńczonego alkoholu;
2. Płukanie w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (PBS) – 3x3 minuty;
3. Blokowanie aktywności endogennej peroksydazy za pomocą 1% H_2O_2 – 30 minut;
4. Płukanie w bieżącej wodzie – 20 minut;
5. Płukanie w wodzie destylowanej – 10 minut;
6. Płukanie w PBS – 3x3 minuty;
7. Inkubacja z roztworem przeciwciał monoklonalnych przeciwko badanym antygenom (1:50) – 18 godzin w temperaturze 5 stopni C, a następnie 30 minut w temperaturze pokojowej;
8. Płukanie w PBS 3x3 minuty;
9. Inkubacja z roztworem biotynylowanych przeciwciał (LSAB2, Dako) – 15 minut;
10. Płukanie w PBS – 3x3 minuty;
11. Inkubacja z kompleksem streptawidyna – biotynylowana peroksydaza (LSAB2, Dako);
12. Płukanie w PBS – 3x3 minuty;
13. Inkubacja z 3-3' diaminobenzydyną (DAB, Dako);

14. Płukanie w bieżącej wodzie – 10 minut;
15. Płukanie w wodzie destylowanej – 5 minut;
16. Odwodnienie z użyciem szeregu alkoholi i ksylenu;
17. Nakrycie preparatów za pomocą balsamu kanadyjskiego.

Nasilenie reakcji immunohistochemicznej zostało ocenione za pomocą półilościowej skali (wg Remmele w modyfikacji Remmele) [97], uwzględniającej zarówno natężenie wybarwienia, jak i odsetek komórek, w których obserwowano reakcję (Tabela V). Wynik jest iloczynem punktów przyznawanych za oceniane parametry i może osiągać wartości w przedziale od 0 do 12. W przypadku pacjentek, dla których wykonano więcej niż jedno oznaczenie nasilenia reakcji immunohistochemicznej, w obliczeniach wykorzystano wartość średnią.

Tabela V. Skala IRS (Immunreaktiven Score) wg Remmele w modyfikacji Remmele.

Odsetek komórek wykazujących reakcję	Natężenie reakcji barwnej
0 brak komórek wykazujących reakcję	0 brak reakcji
1 <10% komórek wykazujących reakcję	1 słaba reakcja
2 10-50% komórek wykazujących reakcję	2 średnie natężenie reakcji
3 51-80% komórek wykazujących reakcję	3 silna reakcja
4 >80% komórek wykazujących reakcję	

Ocenę preparatów w skali IRS przy użyciu mikroskopu świetlnego przeprowadził lek. med. Paweł Surowiak (Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej we Wrocławiu).

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej. Obliczenia przeprowadzono używając :

- pakietu statystycznego R (Bell Laboratories);
- pakietu Statistica for Windows 5.1 PL (StatSoft, Inc);
- Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation).

W obliczeniach zastosowano następujące testy:

- model regresji Coxa;
- metodę Akaike;
- estymator Kaplana-Meiera funkcji przeżycia;
- test Kruskala-Wallisa;
- współczynnik korelacji Kendalla i Spearmana.

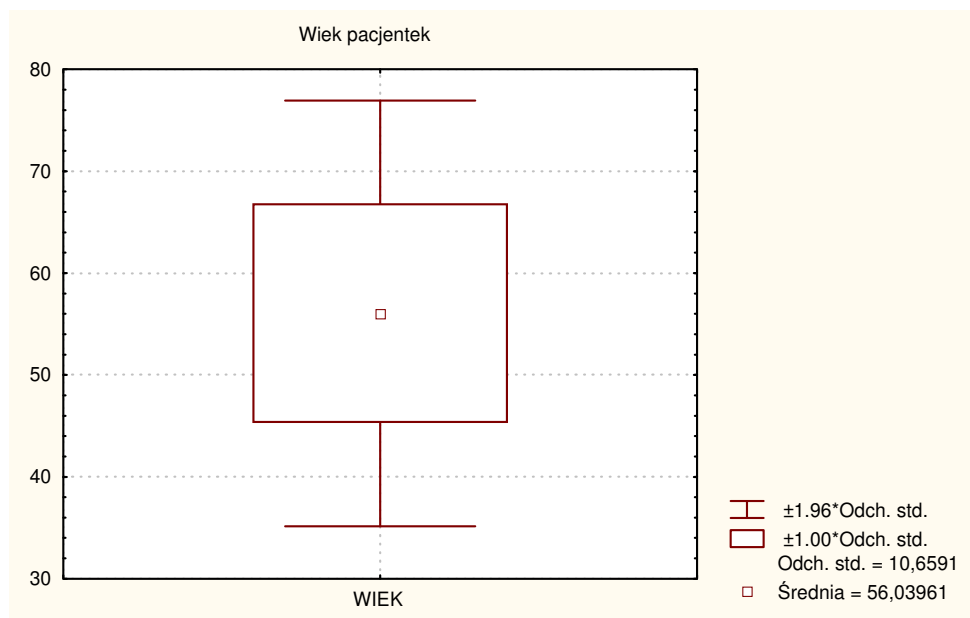
Za pomoc w doborze metod statystycznych, przeprowadzenie obliczeń i nadzór nad prawidłową interpretacją wyników autor pracy składa serdecznie wyrazy wdzięczności prof. dr hab. Tadeuszowi Bednarskiemu (Instytut Informatyki Uniwersytetu Wrocławskiego).

Poniżej przedstawiono charakterystykę badanej grupy chorych.

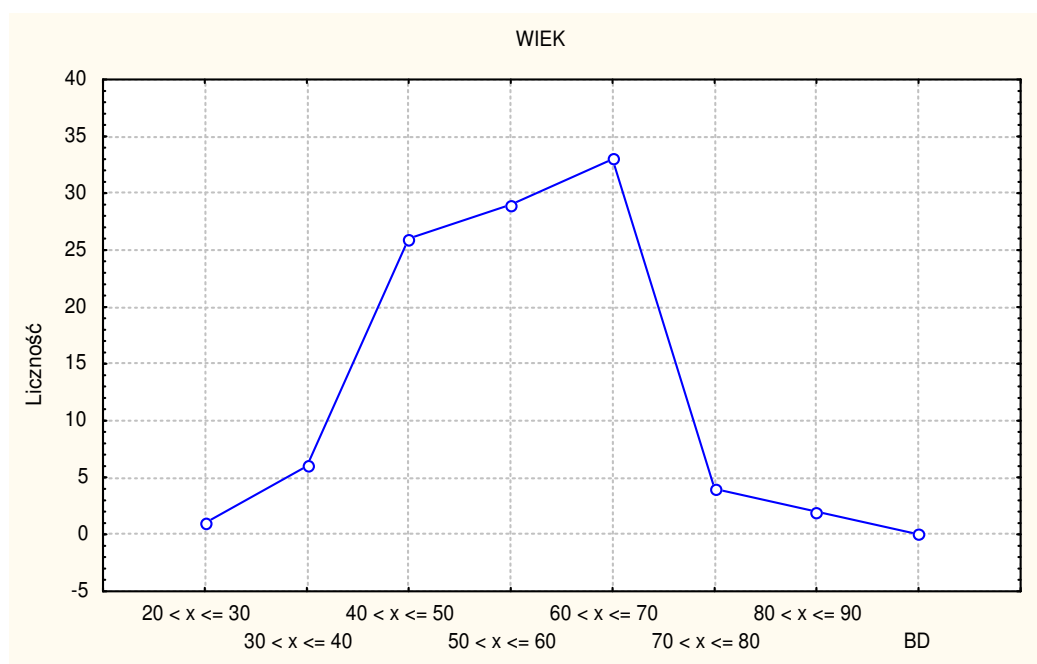
W tabelach VI i VII oraz na rycinach 3 i 4 przedstawiono dane dotyczące rozkładu wieku badanej grupy pacjentek. Średnia wieku chorych wynosiła 56,04 (mediana 57 lat). Najmłodsza pacjentka miała w momencie rozpoznania 29, a najstarsza 86 lat. Rozkład wieku pacjentek był podobny do obserwowanego przez Dolnośląski Rejestr Nowotworów wśród chorych na raka piersi.

Tabela VI. Wiek chorych.

N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp	Odchylenie standardowe
101	56,0396	57	29	86	57	10,65919

Rycina 3. Wykres pudełkowy ilustrujący wiek chorych.**Tabela VII. Rozkład wieku chorych.**

Wiek	Liczność	Skumulo- wana liczność	Procent ważnych	Skumulo- wany % ważnych	% ogółu przypadków	Skumulo- wany % ogółu
20<x<=30	1	1	0,99010	0,9901	0,99010	0,9901
30<x<=40	6	7	5,94059	6,9307	5,94059	6,9307
40<x<=50	26	33	25,74257	32,6733	25,74257	32,6733
50<x<=60	29	62	28,71287	61,3861	28,71287	61,3861
60<x<=70	33	95	32,67327	94,0594	32,67327	94,0594
70<x<=80	4	99	3,96040	98,0198	3,96040	98,0198
80<x<=90	2	101	1,98020	100,0000	1,98020	100,0000
BD	0	101	0,00000		0,00000	100,0000

Rycina 4. Wykres ilustrujący rozkład wieku chorych.

Poniżej przedstawiono analizę wielkości guza nowotworowego stwierdzanego u chorych w momencie rozpoznania (Tabele VIII i XI, Ryciny 5 i 6). W badanej grupie średni rozmiar guza wynosił 3,19 cm, natomiast mediana 3 cm. Najmniejszy guz nie był wykrywalny w badaniu klinicznym ($T_0 = 0$ cm), a największy miał 7,5 cm.

Tabela VIII. Wielkość guza.

N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp	Odchylenie standardowe
101	3,192079	3	0	7,5	7,5	1,02788

Rycina 5. Wykres pudełkowy wielkości guza.

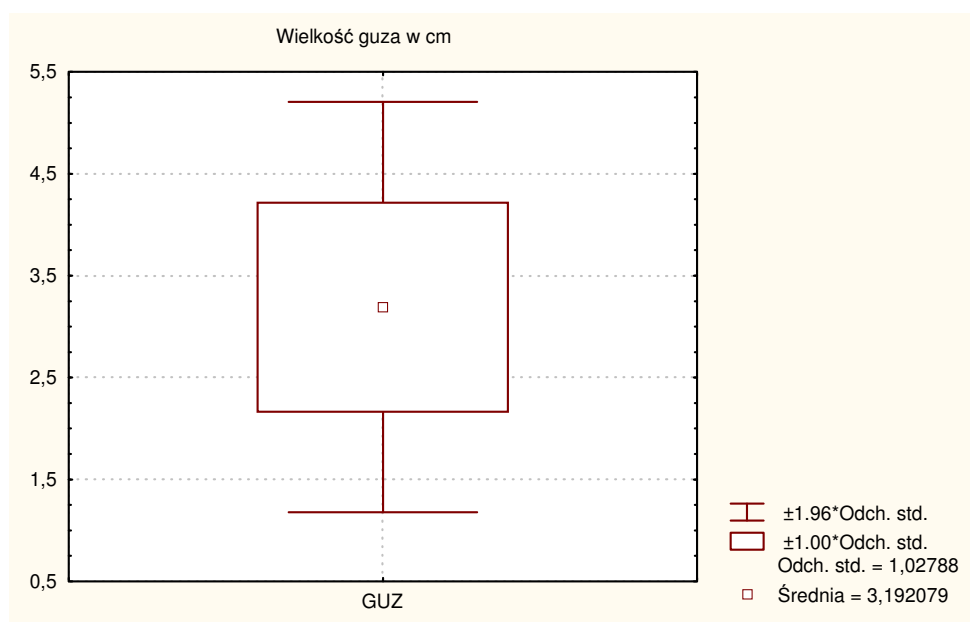
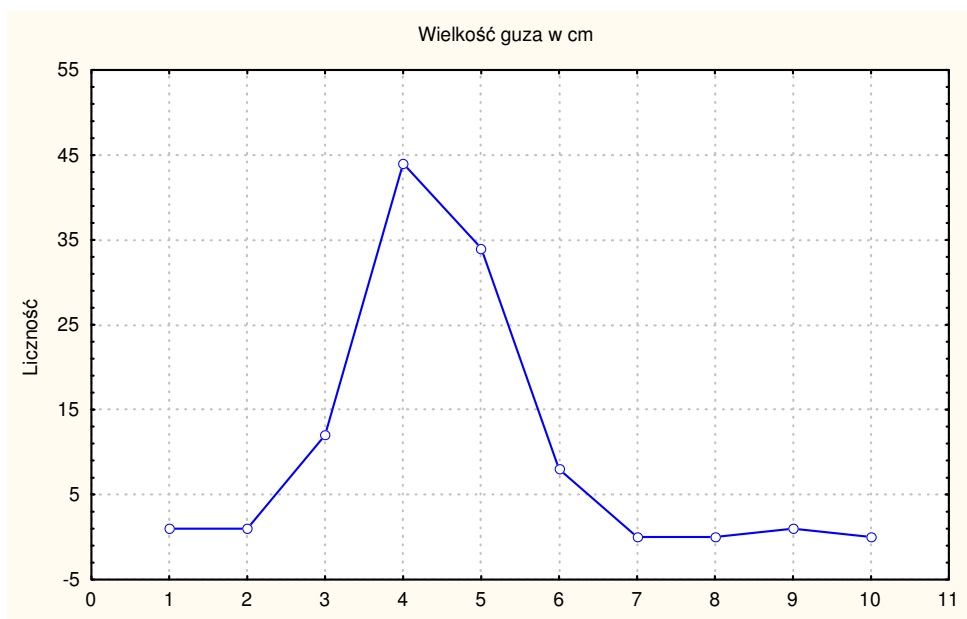


Tabela IX. Rozkład wielkości guza.

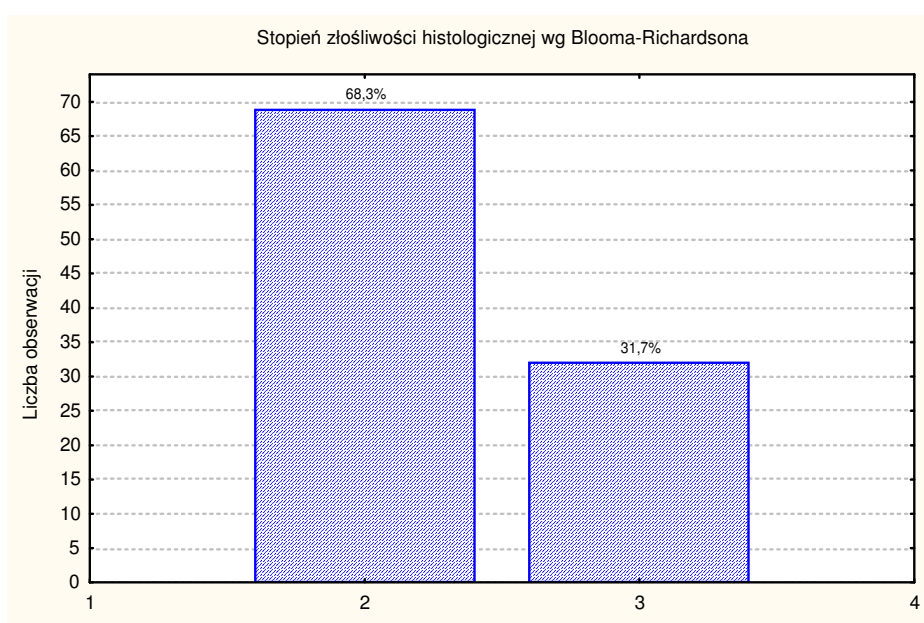
Guz	Liczność	Skumulo- wana liczność	Procent ważnych	Skumulo- wany % ważnych	% ogółu przypadków	Skumulo- wany % ogółu
$x = 0$	1	1	0,99010	0,9901	0,99010	0,9901
$0 < x \leq 1,0$	1	2	0,99010	1,9802	0,99010	1,9802
$1,0 < x \leq 2,0$	12	14	11,88119	13,8614	11,88119	13,8614
$2,0 < x \leq 3,0$	44	58	43,56436	57,4257	43,56436	57,4257
$3,0 < x \leq 4,0$	34	92	33,66337	91,0891	33,66337	91,0891
$4,0 < x \leq 5,0$	8	100	7,92079	99,0099	7,92079	99,0099
$5,0 < x \leq 6,0$	0	100	0,00000	99,0099	0,00000	99,0099
$6,0 < x \leq 7,0$	0	100	0,00000	99,0099	0,00000	99,0099
$7,0 < x \leq 8,0$	1	101	0,99010	100,0000	0,99010	100,0000
BD	0	101	0,00000		0,00000	100,0000

Rycina 6. Diagram obrazujący rozkład wielkości guza.



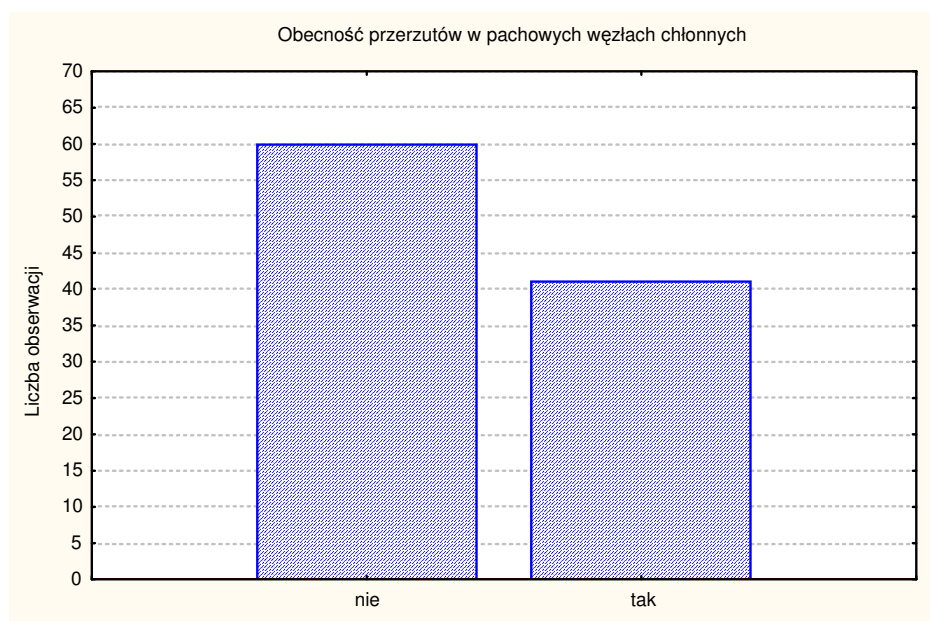
W badaniu obserwowano pacjentki z rakiem w 2 i 3 stopniu złośliwości histologicznej wg Blooma-Richardsona (Rycina 7). W badanych preparatach w większości przypadków (68,32%) stwierdzono raka w 2 stopniu złośliwości histologicznej.

Rycina 7. Stopień złośliwości histologicznej guzów piersi wg Blooma-Richardsona.



Na podstawie badania histopatologicznego ustalono stan pachowych węzłów chłonnych. U 41 pacjentek (40,6%) stwierdzono obecność przerzutów w węzłach chłonnych w badaniu patologicznym preparatu pooperacyjnego (Rycina 8).

Rycina 8. Histogram obrazujący stan pachowych węzłów chłonnych oceniony na podstawie badania histopatologicznego.



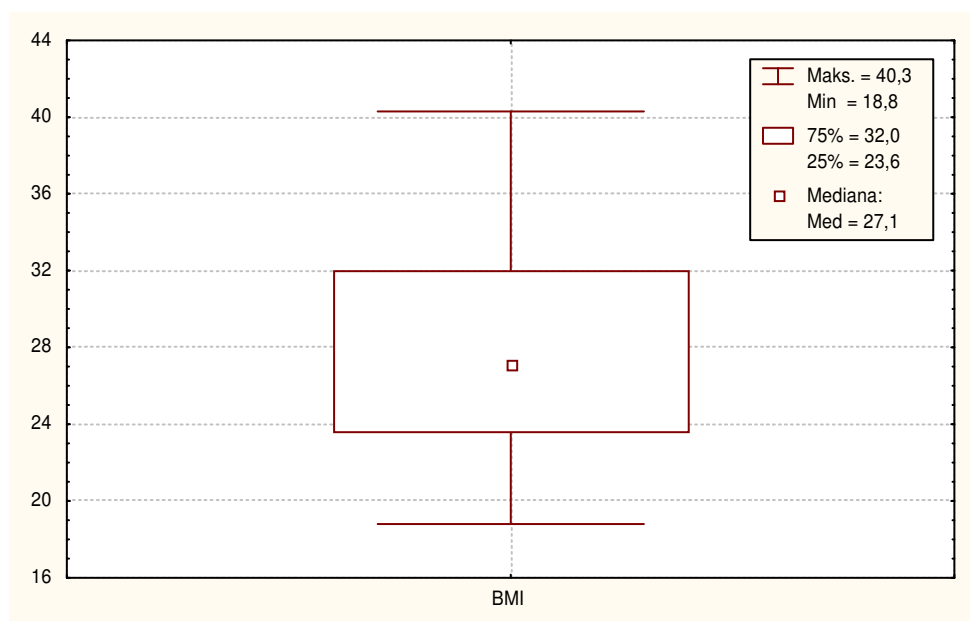
U 82 pacjentek ustalono masę ciała i wzrost, na podstawie których obliczono BMI (Rycina 9 i 11 oraz Tabela X) i zakwalifikowano je do 3 grup wagowych: 29 osób mieściło się w granicach normy wagowej, u 22 stwierdzono nadwagę a u 31 otyłość (Rycina 10). Posłużono się kryteriami wg Broca:

- otyłość ≥ 30 BMI,
- $30 \text{ BMI} > \text{nadwaga} > 24,5 \text{ BMI}$,
- norma $\leq 24,5 \text{ BMI}$.

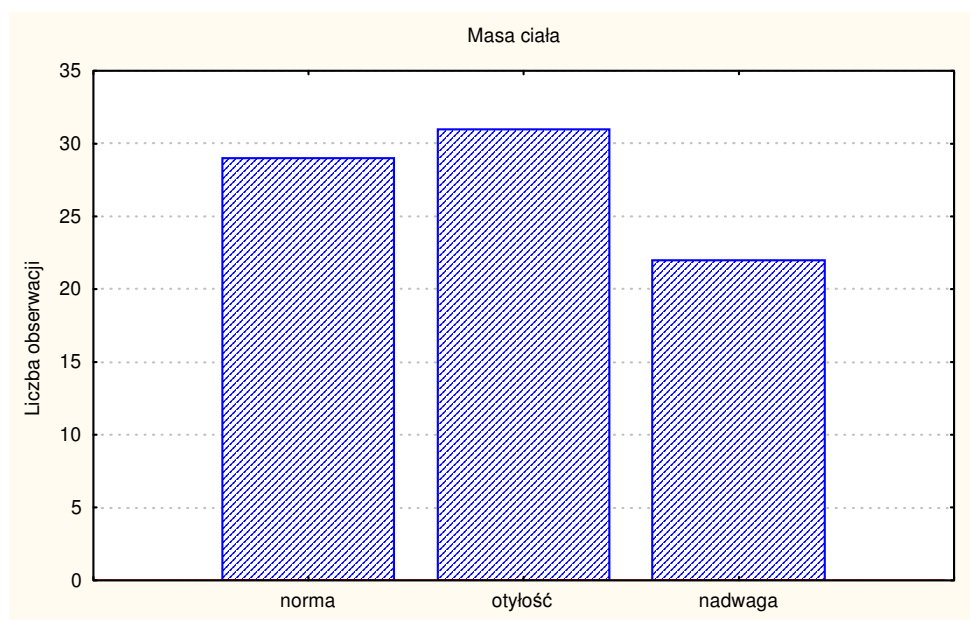
Tabela X. Wartości BMI.

N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp	Odchylenie standardowe
82	28,31585	27,1	18,8	40,3	21,5	5,345945

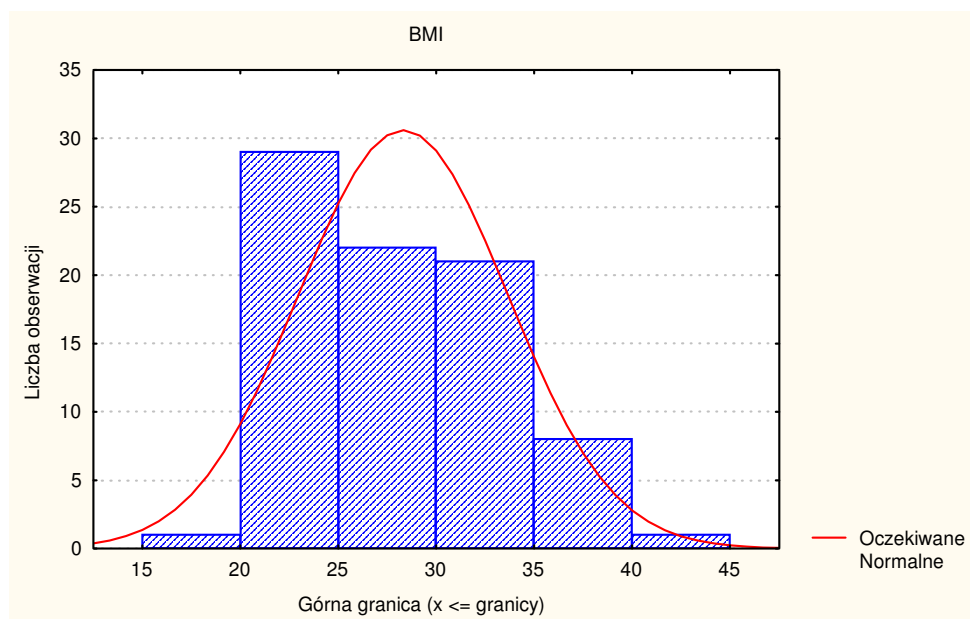
Rycina 9. Wykres pudełkowy wartości BMI.



Rycina 10. Histogram częstości obrazujący stan odżywienia.

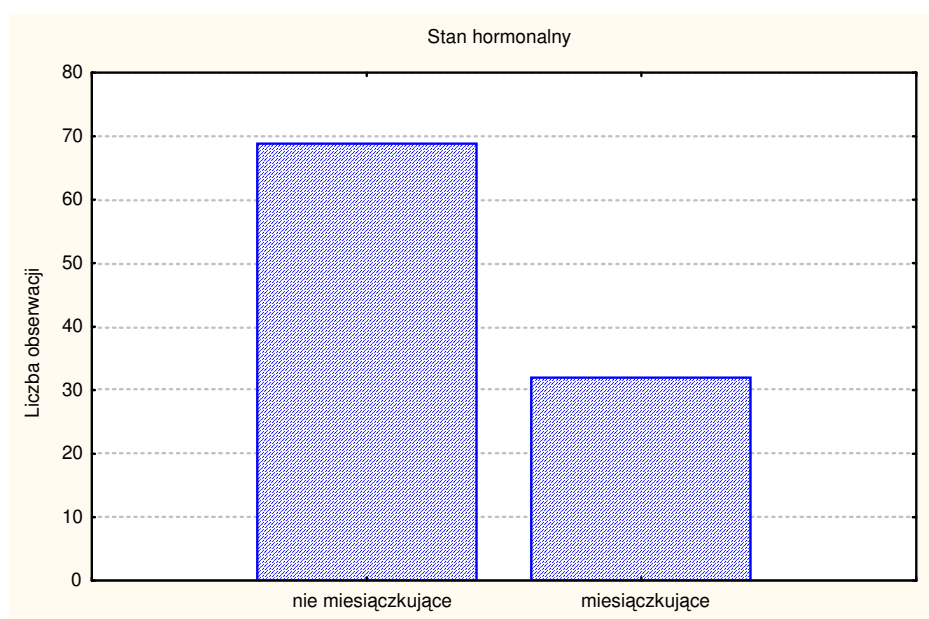


Rycina 11. Wykres słupkowy obrazujący rozkład BMI.



Ustalono również stan hormonalny obserwowanych chorych (Rycina 12). W momencie rozpoznania 69 (68,3%) pacjentek było w okresie pomenopauzalnym, natomiast 32 (31,68%) nadal miesiączkowało.

Rycina 12. Stan hormonalny pacjentek.



Oceniono czas trwania okresu miesiączkowania w latach (Ryciny 13 i 14, Tabele XI i XII). Średnia czasu wynosiła w momencie rozpoznania 33,28 lat, a mediana 33 lata. Najkrótszy obserwowany czas to 13, a najdłuższy – 45 lat. U ponad połowy pacjentek (65 osób) okres ten wynosił od 30 do 40 lat.

Tabela XI. Czas trwania okresu miesiączkowania w latach.

N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp	Odchylenie standardowe
101	33,28713	33,0	13,0	45,0	32,0	5,71898

Rycina 13. Wykres pudełkowy obrazujący czas trwania okresu miesiączkowania.

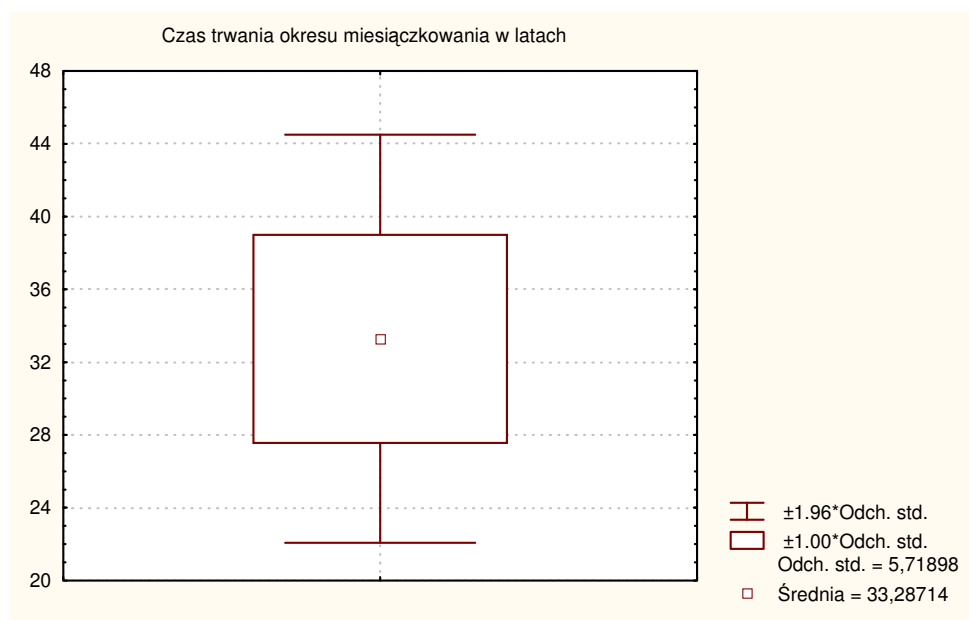
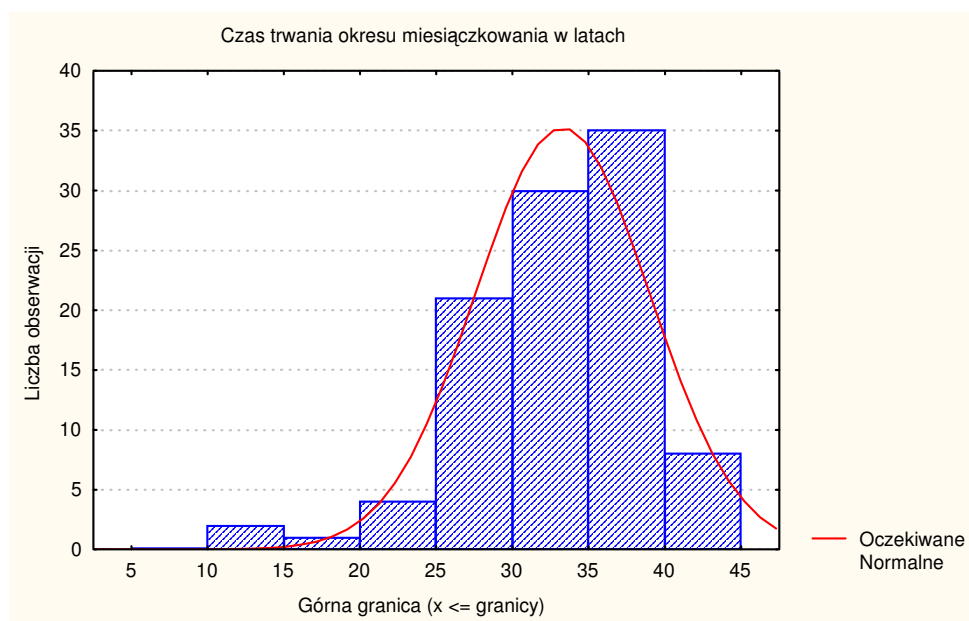


Tabela XII. Rozkład wartości czasu trwania okresu miesiączkowania w latach.

	Liczność	Skumulo- wana liczność	Procent ważnych	Skumulo- wany % ważnych	% ogółu przypadków	Skumulo- wany % ogółu
5<x<=10	0	0	0,00000	0,0000	0,00000	0,0000
10<x<=15	2	2	1,98020	1,9802	1,98020	1,9802
15<x<=20	1	3	0,99010	2,9703	0,99010	2,9703
20<x<=25	4	7	3,96040	6,9307	3,96040	6,9307
25<x<=30	21	28	20,79208	27,7228	20,79208	27,7228
30<x<=35	30	58	29,70297	57,4257	29,70297	57,4257
35<x<=40	35	93	34,65347	92,0792	34,65347	92,0792
40<x<=45	8	101	7,92079	100,0000	7,92079	100,0000
BD	0	101	0,00000		0,00000	100,0000

Rycina 14. Wykres słupkowy obrazujący rozkład czasu trwania okresu miesiączkowania.

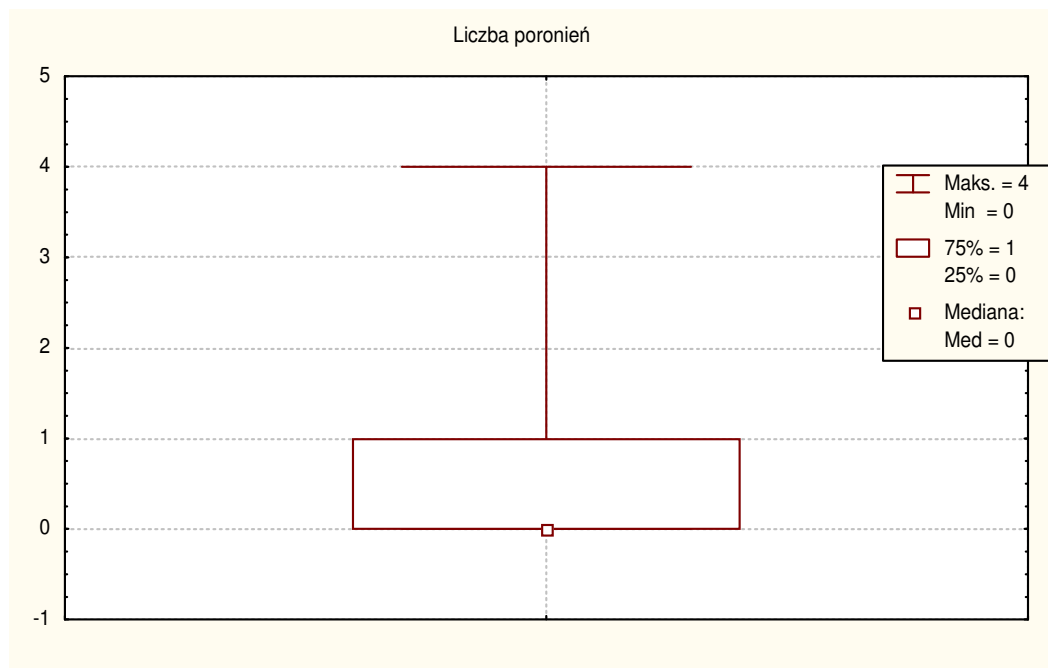


Ustalono liczbę poronień w obserwowanej grupie chorych (Tabele XIII i XIV, Ryciny 15 i 16). Ze względu na uwarunkowania społeczne i prawne informacje te mogą być niepełne. W wywiadach, na których oparłem się przy kompletowaniu danych, nie rozdzielono poronień sztucznych od naturalnych.

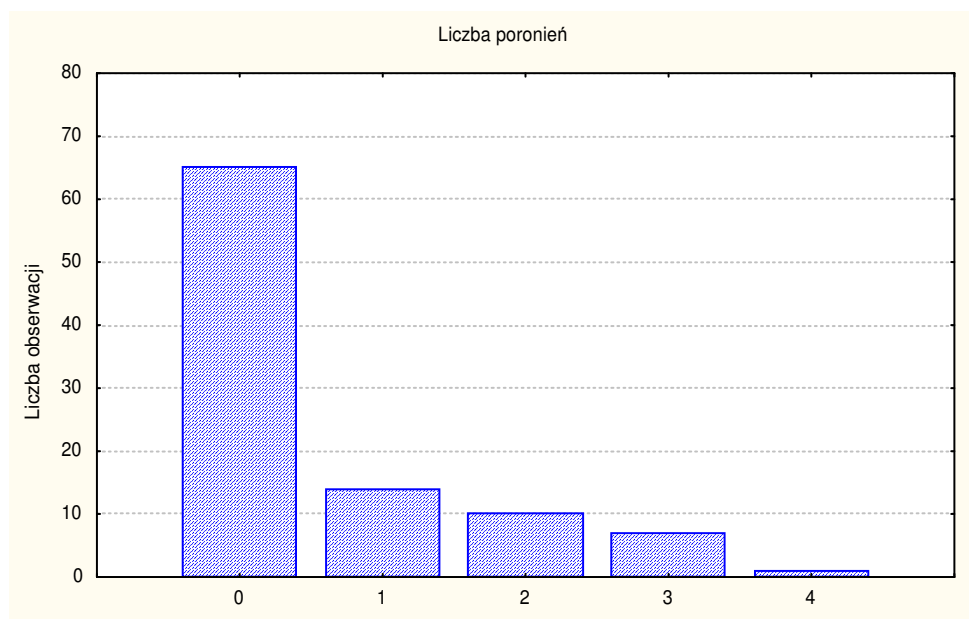
Tabela XIII. Liczba poronień

N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp	Odchylenie standardowe
97	0,608247	0	0	4	4	1,005782

Dane uzyskano od 97 pacjentek. Wśród nich 65 kobiet nie roniło. Tylko jedna chora roniła 4 razy. Natomiast 14 kobiet roniło jeden raz, 10 – dwa razy i 7 – trzy razy.

Rycina 15. Liczba poronień w badanej grupie chorych.**Tabela XIV. Rozkład ilości poronień.**

Liczba poronień	Liczność	Skumulowana liczność	Procent ważnych	Skumulowany % ważnych	% ogółu przypadków	Skumulowany % ogółu
0	65	65	67,01031	67,0103	64,35644	64,3564
1	14	79	14,43299	81,4433	13,86139	78,2178
2	10	89	10,30928	91,7526	9,90099	88,1188
3	7	96	7,21649	98,9691	6,93069	95,0495
4	1	97	1,03093	100,0000	0,99010	96,0396
Brak danych	4	101	4,12371		3,96040	100,0000

Rycina 16. Wykres słupkowy obrazujący liczbę poronień.

Zebrano wywiad dotyczący liczby porodów w obserwowanej grupie chorych. Nie dokonano rozróżnienia na porody naturalne i cięcia cesarskie. Dane uzyskano od 97 pacjentek. Wśród nich 10 kobiet nie rodziło. Najwięcej pacjentek, bo 43, rodziło dwa razy. Poniżej, w tabelach XV i XVI i na rycinach 17 i 18, przedstawiono szczegółowe dane.

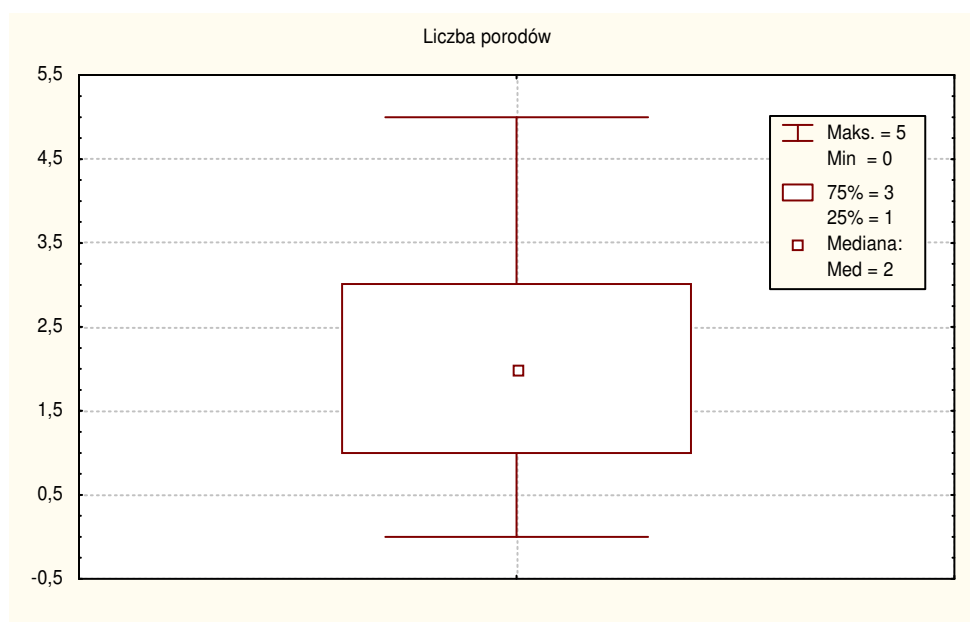
Tabela XV. Liczba porodów.

N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp	Odch.Std
97	2,010309	2	0	5	5	1,185809

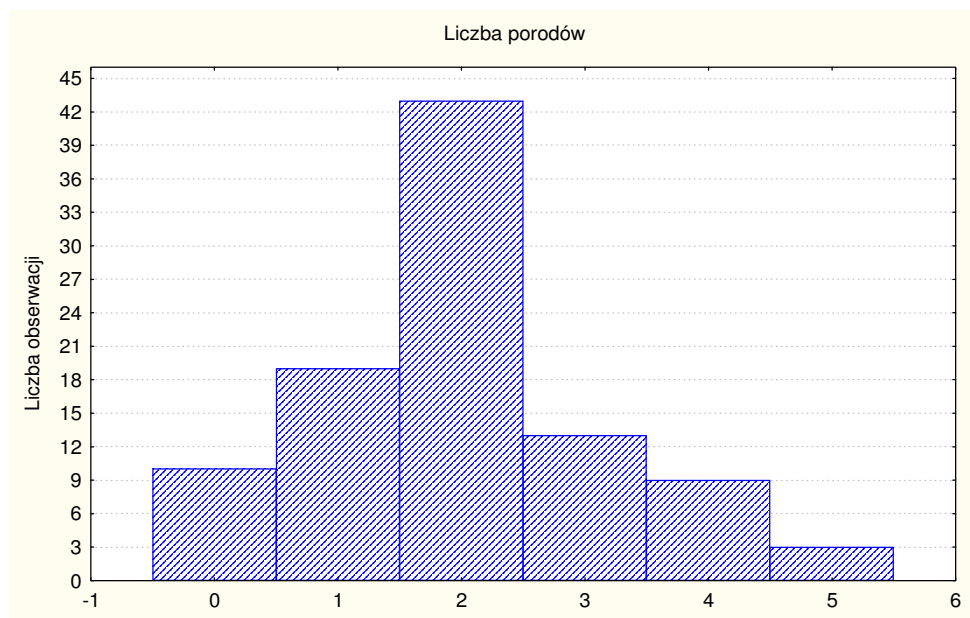
Tabela XVI. Rozkład ilości porodów.

Liczba poronień	Liczność	Skumulo- wana liczność	Procent ważnych	Skumulo- wany % ważnych	% ogółu przypadków	Skumulo- wany % ogółu
0	10	10	10,30928	10,3093	9,90099	9,9010
1	19	29	19,58763	29,8969	18,81188	28,7129
2	43	72	44,32990	74,2268	42,57426	71,2871
3	13	85	13,40206	87,6289	12,87129	84,1584
4	9	94	9,27835	96,9072	8,91089	93,0693
5	3	97	3,09278	100,0000	2,97030	96,0396
BD	4	101	4,12371		3,96040	100,0000

Rycina 17. Liczba porodów w badanej grupie chorych.



Rycina 18. Wykres słupkowy obrazujący liczbę porodów.



Dziesięć pacjentek było wcześniej leczonych z powodu innego nowotworu:

- 7 z powodu raka piersi;
- 1 z powodu czerniaka skóry;
- 1 z powodu kosmówczaka;
- 1 z powodu raka skóry powieki.

Siedem osób zgłosiło zachorowanie na raka piersi wśród krewnych pierwszego stopnia:

- 5 u matki;
- 1 u córki;
- 1 u matki i siostry.

W wywiadzie rodzinnym 24 chore zgłosiły zachorowanie na nowotwory inne niż rak sutka:

- rak płuca u 4 osób;
- rak żołądka u 6 osób;
- rak narządu rodniego u 7 osób;
- rak jelita grubego u 3 osób;
- po jednym przypadku raka pęcherza, krtani, prącia i trzustki.

Najczęstszą lokalizacją ogniska pierwotnego był kwadrant górny zewnętrzny – w 28 przypadkach. W dalszej kolejności guz zlokalizowany był:

- na granicy górnych kwadrantów – u 20 chorych;
- w kwadrancie dolnym zewnętrznym – u 12 chorych;
- w kwadrancie górnym wewnętrznym – u 11 chorych;
- u 30 chorych inna lub nieokreślona lokalizacja zmiany.

W grupie pacjentek obserwowanych dla celów niniejszej pracy u 6 (5,9%) chorych stwierdzono raka wielogniskowego, natomiast u jednej osoby (0,99%) – obustronnego.

WYNIKI

Poniżej, w tabelach XVII i XVIII oraz na rycinie 19, przedstawiono dane dotyczące całkowitego czasu przeżycia (OS) obserwowanej grupy 101 pacjentek. Okres obserwacji każdej chorej był cenzurowany na poziomie 5 lat, czyli 261 tygodni, dlatego maksimum wynosiło 261 tygodni. Średni czas obserwacji to 244,4 tygodnie, najkrótszy – 32 tygodnie.

Tabela XVII. Czas przeżycia całkowitego.

N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp	Odchylenie standardowe
101	244,4158	261	32	261	229	45,47621

Rycina 19. Wykres pudełkowy ilustrujący czas przeżycia całkowitego.

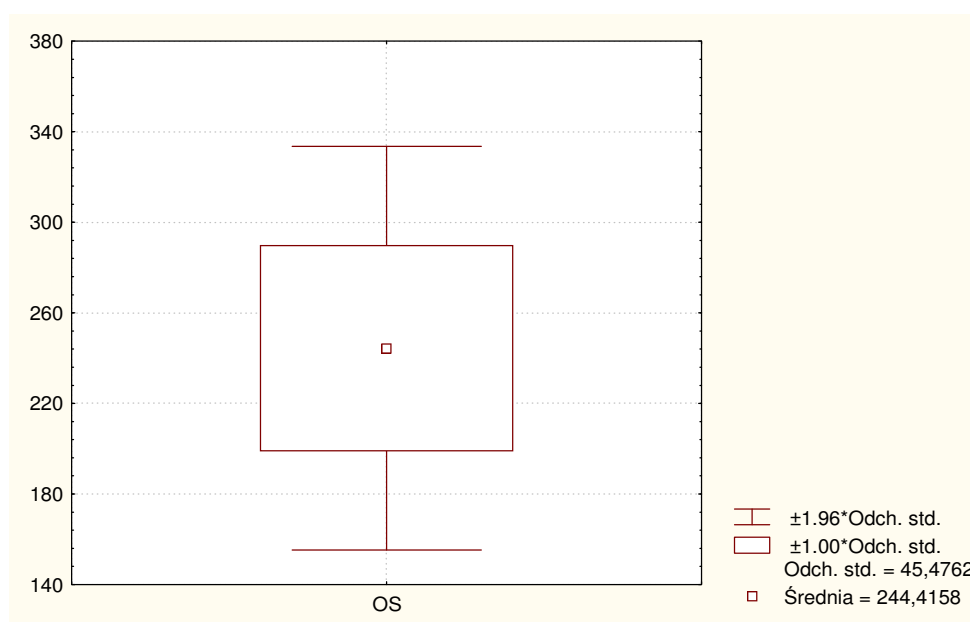
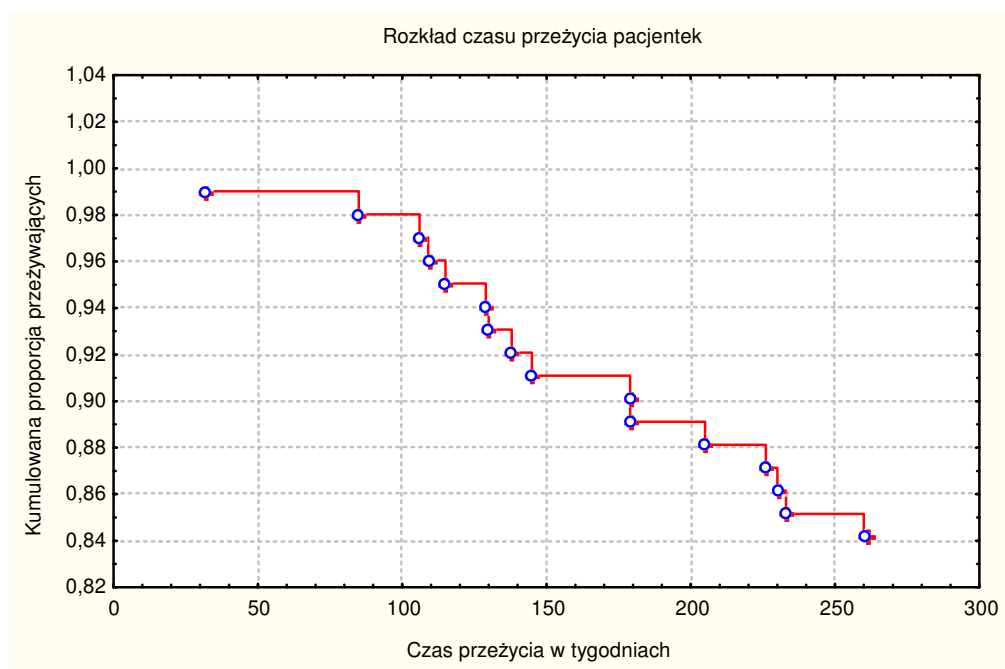


Tabela XVIII. Czas przeżycia całkowitego dla poszczególnych chorych.

Skumulowana liczność	OS w tygodniach	Skumulowane przeżycie	Błąd standardowy
1	32	0,990099	0,009852
2	85	0,980198	0,013863
3	106	0,970297	0,016892
4	109	0,960396	0,019406
5	115	0,950495	0,021584
6	129	0,940594	0,023521
7	130	0,930693	0,025271
8	138	0,920792	0,026872
9	145	0,910891	0,028349
10	179	0,900990	0,029719
11	179	0,891089	0,030998
12	205	0,881188	0,032196
13	226	0,871287	0,033322
14	230	0,861386	0,034383
15	233	0,851485	0,035384
16	260	0,841584	0,036332

W ciągu pięciu lat po leczeniu zmarło 16 pacjentek. Znamienne, że najwięcej chorych zmarło w trzecim (7 osób), w piątym (4 osoby) i czwartym (3 osoby) roku obserwacji. Najmniejszą liczbę zgonów obserwowano w pierwszym i drugim roku po leczeniu – po jednej osobie. Pozostałych 85 pacjentek żyło dłużej niż 5 lat od rozpoznania. Pięcioletnie przeżycie w badanej grupie chorych wynosiło 84,16%.

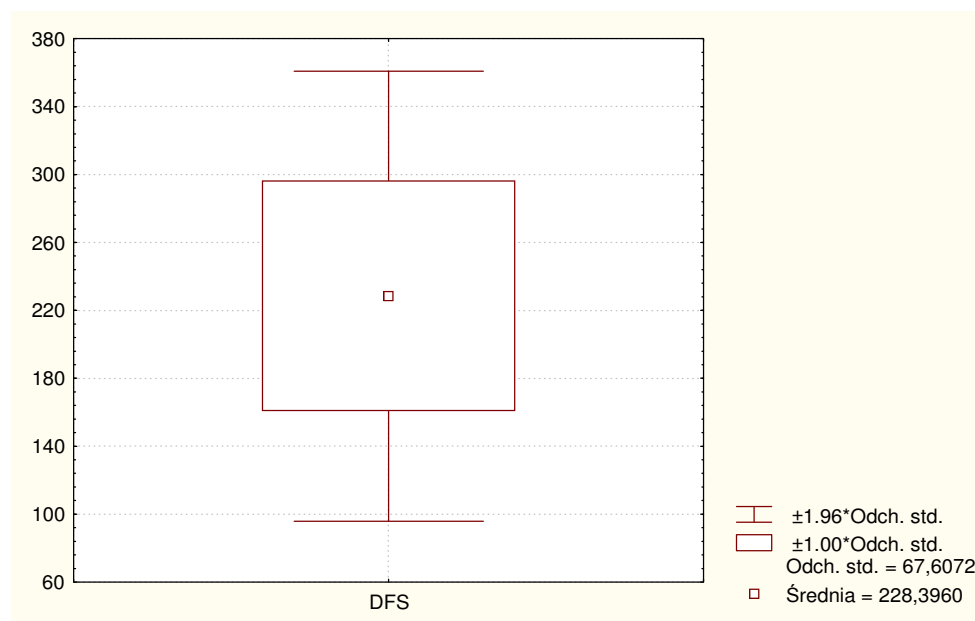
Kolejna rycina przedstawia estymator Kaplana-Meiera [56] dla funkcji przeżycia pacjentek z rakiem sutka na podstawie danych wszystkich chorych. Wykres niesie informację o rozkładzie czasu przeżycia do granicznej wartości 5 lat (Rycina 20).

Rycina 20. Rozkład czasu przeżycia pacjentek

Podobne obliczenia przeprowadzono dla czasu przeżycia wolnego od objawów choroby nowotworowej (Rycina 21, Tabele XIX i XX). Podobnie jak w przypadku OS czas obserwacji był cenzurowany na poziomie 5 lat czyli 261 tygodni. U 77 chorych nie stwierdzono nawrotu choroby, u 3 obserwowano izolowaną wznowę miejscową – żadna z tych osób nie zmarła w czasie pięcioletniej obserwacji. Natomiast u 21 pacjentek stwierdzono rozsiew do narządów odległych - jedynie 5 spośród nich żyło powyżej 5 lat od rozpoznania choroby nowotworowej.

Tabela XIX. Czas przeżycia wolnego od objawów choroby.

N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp	Odchylenie standardowe
101	228,396	261	24	261	237	67,60726

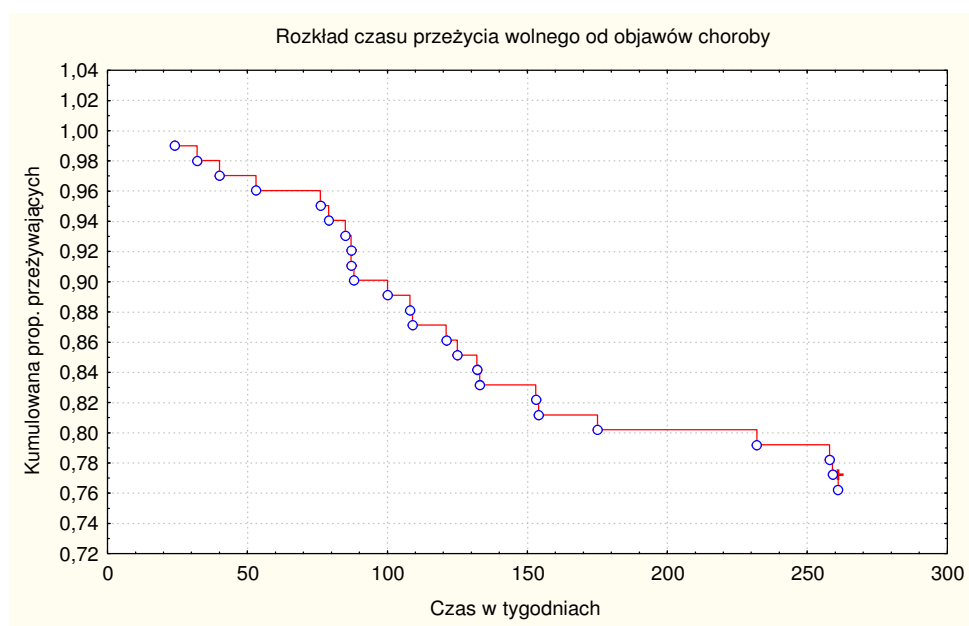
Rycina 21. Wykres pudełkowy ilustrujący DSF.**Tabela XX. Czas wykrycia nawrotu u poszczególnych chorych.**

Skumulowana liczność	DFS w tygodniach	Skumulowane DFS	Błąd standardowy
1	24	0,990099	0,009852
2	32	0,980198	0,013863
3	40	0,970297	0,016892
4	53	0,960396	0,019406
5	76	0,950495	0,021584
6	79	0,940594	0,023521
7	85	0,930693	0,025271
8	87	0,920792	0,026872
9	87	0,910891	0,028349
10	88	0,900990	0,029719
11	100	0,891089	0,030998
12	108	0,881188	0,032196
13	109	0,871287	0,033322
14	121	0,861386	0,034383
15	125	0,851485	0,035384
16	132	0,841584	0,036332
17	133	0,831683	0,037229
18	153	0,821782	0,038080
19	154	0,811881	0,038887
20	175	0,801980	0,039653
21	232	0,792079	0,040381
22	258	0,782178	0,041072
23	259	0,772277	0,041728
24	261	0,762376	0,042352

W pierwszym roku od leczenia rozpoznano 3 nawroty choroby, w drugim i trzecim roku – po 8 przypadków nawrotu, w czwartym – 1 i w piątym 4. Pięcioletni okres przeżycia wolny od objawów choroby nowotworowej wynosił w obserwowanej grupie pacjentek 76,24%.

Poniższa rycina przedstawia estymator Kaplana-Meiera dla funkcji przeżycia bez objawów choroby pacjentek z rakiem sutka na podstawie danych wszystkich chorych. Wykres niesie informację o rozkładzie DFS do granicznej wartości 5 lat (Rycina 22).

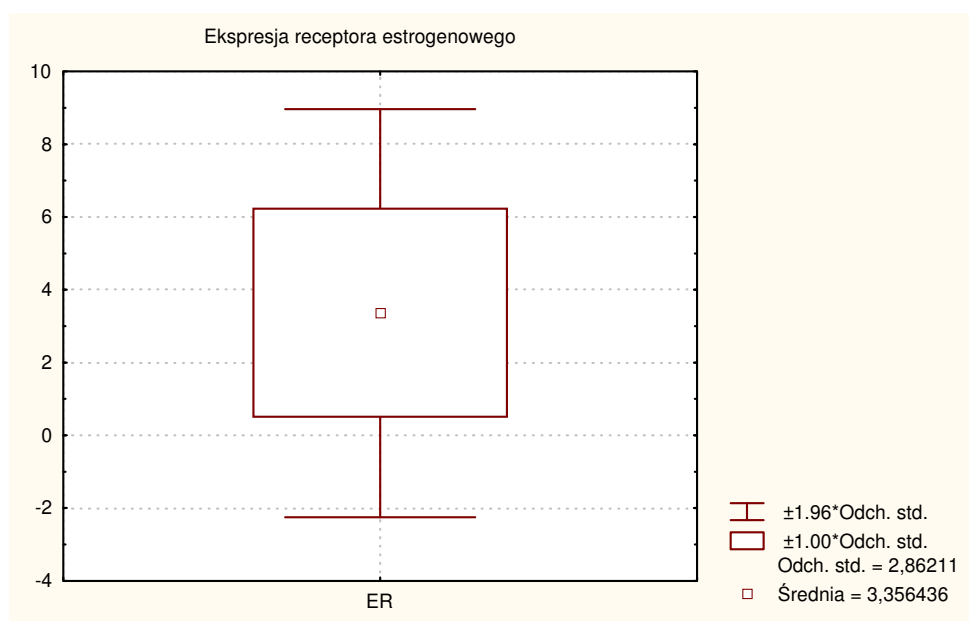
Rycina 22. Rozkład DFS chorych z rakiem piersi.



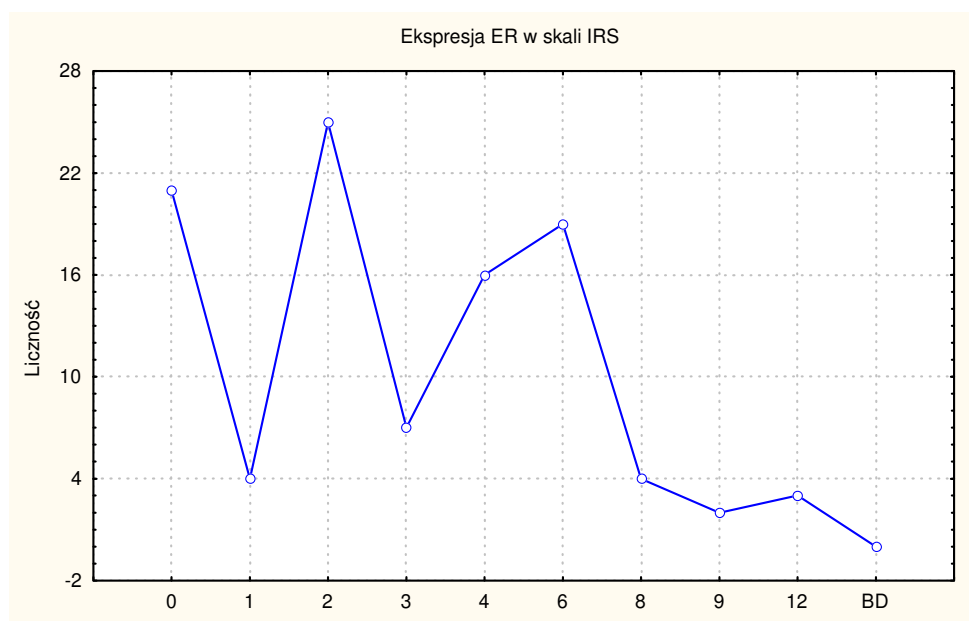
Poniżej analizowano i przedstawiono w formie tabelarycznej i graficznej dane dotyczące nasilenia ekspresji receptora estrogenowego (ER) w badanym materiale tkankowym (Ryciny 23 i 24, Tabele XXI i XXII). Nie stwierdzono ekspresji receptora estrogenowego u 21 chorych (20,79%). Średnia jej wartość, oznaczona w półilościowej skali IRS, wynosiła 3,36, natomiast mediana – 3.

Tabela XXI. Nasilenie ekspresji receptora estrogenowego w skali IRS.

N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp	Odchylenie standardowe
101	3,356436	3	0	12	12	2,862112

Rycina 23. Wykres pudełkowy obrazujący wartości nasilenia ekspresji receptora estrogenowego oznaczone w półilościowej skali IRS.**Tabela XXII. Rozkład nasilenia ekspresji receptora estrogenowego.**

ER	Liczność	Skumulowa liczność	Procent ważnych	Skumulowany % ważnych	% ogółu przypadków	Skumulowany % ogółu
0	21	21	20,79208	20,7921	20,79208	20,7921
1	4	25	3,96040	24,7525	3,96040	24,7525
2	25	50	24,75248	49,5050	24,75248	49,5050
3	7	57	6,93069	56,4356	6,93069	56,4356
4	16	73	15,84158	72,2772	15,84158	72,2772
6	19	92	18,81188	91,0891	18,81188	91,0891
8	4	96	3,96040	95,0495	3,96040	95,0495
9	2	98	1,98020	97,0297	1,98020	97,0297
12	3	101	2,97030	100,0000	2,97030	100,0000
BD	0	101	0,00000		0,00000	100,0000

Rycina 24. Wykres obrazujący rozkład ekspresji receptora estrogenowego.

Podobną analizę przeprowadzono dla wartości nasilenia ekspresji białka nm23-H1, oznaczanej w półilościowej skali IRS (Tabele XXIII i XXIV, Ryciny 25 i 26). Średnie nasilenie ekspresji wynosiło 2,83, natomiast mediana – 2 w skali IRS. Nie wykazano ekspresji białka nm23-H1 u 26 pacjentek. U żadnej chorej nie stwierdzono ekspresji 12 wg IRS, a jedynie u 11 większą niż 6. U ponad połowy pacjentek (55 osób) wartości te mieściły się w granicach od 0 do 2.

Tabela XXIII. Nasilenie ekspresji białka nm23-H1. Wartości podane są w półilościowej skali IRS.

N ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp	Odchylenie standardowe
100	2,83	2	0	9	9	2,624881

Rycina 25. Wykres pudełkowy obrazujący wartości nasilenia ekspresji białka nm23-H1 oznaczane w półilościowej skali IRS.

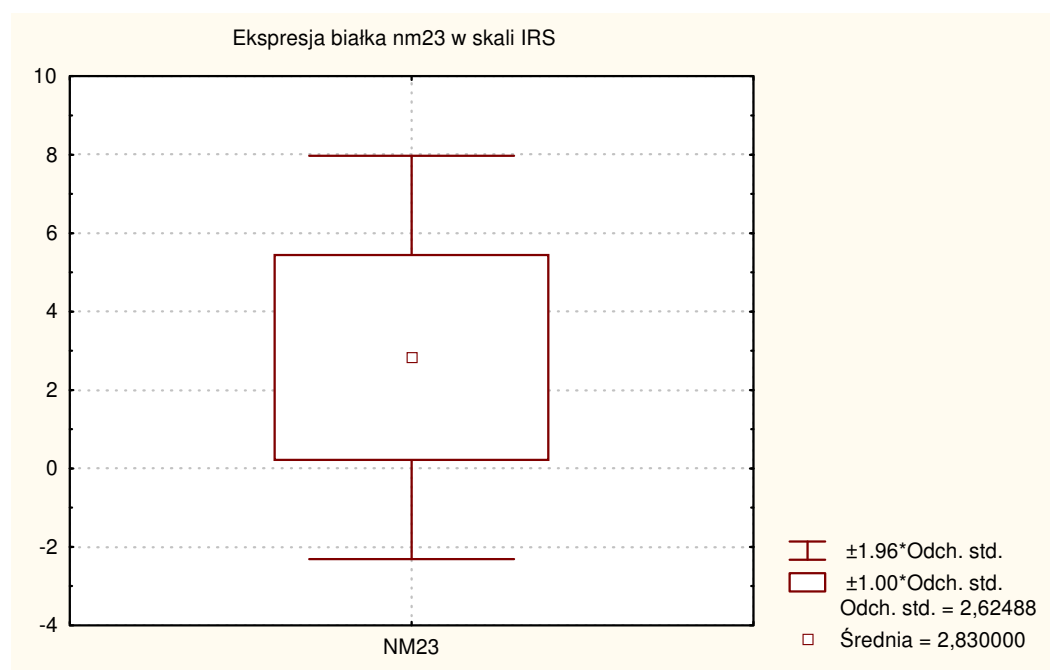
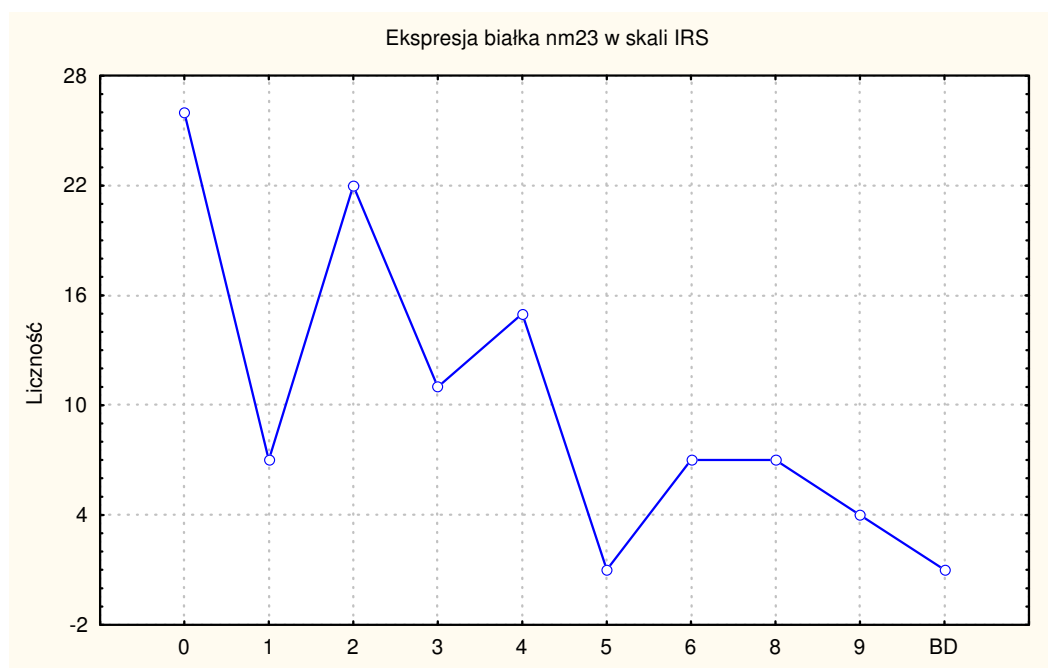


Tabela XXIV. Rozkład nasilenia ekspresji białka nm23-H1.

Białko nm23	Liczność	Skumulowana liczność	Procent ważnych	Skumulowany % ważnych	% ogółu przypadków	Skumulowany % ogółu
0	26	26	26,0	26,0	25,74257	25,7426
1	7	33	7,0	33,0	6,93069	32,6733
2	22	55	22,0	55,0	21,78218	54,4554
3	11	66	11,0	66,0	10,89109	65,3465
4	15	81	15,0	81,0	14,85149	80,1980
5	1	82	1,0	82,0	0,99010	81,1881
6	7	89	7,0	89,0	6,93069	88,1188
8	7	96	7,0	96,0	6,93069	95,0495
9	4	100	4,0	100,0	3,96040	99,0099
BD	1	101	1,0		0,99010	100,0000

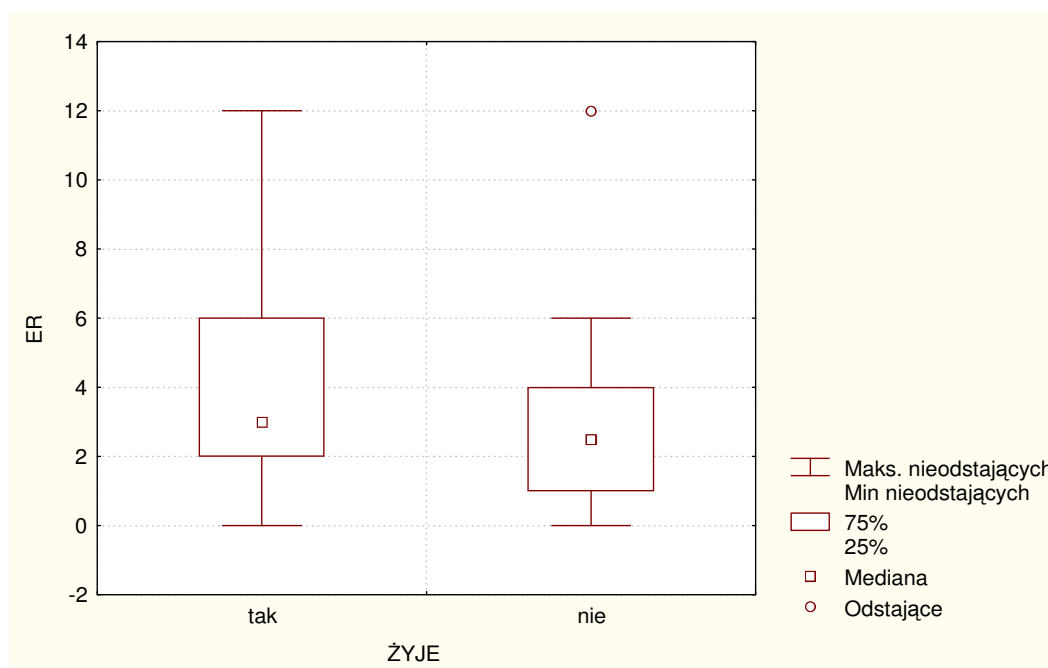
Rycina 26. Diagram obrazujący rozkład ekspresji białka nm23-H1.



WYNIKI ANALIZY STATYSTYCZNEJ CZASU PRZEŻYCIA CAŁKOWITEGO

Zasadniczym celem moich badań była analiza danych dotyczących przeżycia całkowitego (OS) pacjentek. Najczęściej stosowanym narzędziem statystycznym w analizie przeżycia jest model Coxa. We wstępnej analizie porównywano dane dla grupy pacjentek, które zmarły przed upływem 5 lat obserwacji i dla tych, które żyły co najmniej 5 lat od chwili diagnozy. Na poniższym wykresie pudełkowym (Rycina 27) przedstawiono dane dla receptora estrogenowego.

Rycina 27. Wykres pudełkowy przedstawiający zależność pomiędzy OS a ER oraz „wartość odstającą” ER w grupie pacjentek, które zmarły.



Wykres odpowiadający osobom zmarłym w ciągu pięciu lat obserwacji jest przesunięty w stronę mniejszych wartości, co wskazuje na to, że receptor estrogenowy mógł być czynnikiem rokowniczym. Na wykresie widać także, że wśród chorych, które zmarły, był przypadek istotnie różny od pozostałych (tzw. outlier, wartość odstająca). Przypadek ten, w zależności od tego, czy włączymy go do analizowanego zbioru danych czy nie, prowadzi do różnych wniosków dotyczących wpływu poszczególnych czynników na rozkład czasu życia obserwowanych pacjentek. Standardem statystycznej analizy danych jest pominięcie wartości odstającej w procesie analizy danych z odnotowaniem faktu pominięcia, jako że może to być zaczątkiem dalszych badań. Okazuje się, że przypadek będący „wartością odstającą” to pacjentka u której ER wynosi 12 w skali IRS. A zatem pacjentki z ER równym 12 były „inne” lub oznaczenie wartości receptora w tym przypadku było obarczone błędem. Po ponownej ocenie skrawka parafinowego wykluczono jednak tę drugą możliwość. Zdecydowano o wyłączeniu z analizy 3 pacjentek, u których wartość receptora estrogenowego wynosi 12. Należy zaznaczyć, że również inni autorzy [121] zaobserwowali, że

chore z wysokim poziomem receptora estrogenowego obciążone były złym rokowaniem, podobnym jak te, u których nie wykazano obecności ER.

Pierwsza analiza była wykonana na podstawie maksymalnego zestawu danych i zmiennych objaśniających z pominięciem pacjentek o poziomie receptora estrogenowego równym 12, a także z pominięciem tych pacjentek, których dane były niepełne.

Do pierwszego analizowanego modelu Coxa włączono następujące parametry kliniczno-patologiczne (zmienne objaśniające):

1. „ER” - receptor estrogenowy – wartości od 0 do 12,
2. „nm23” - białko nm23 – wartości od 0 do 12,
3. „Wielkość guza” - wielkość guza w centymetrach,
4. „Wiek” - wiek w latach,
5. „Stopień UICC” - stopień zaawansowania klinicznego (2a lub 2b),
6. „Stopień wg Blooma” - stopień złośliwości histologicznej wg Blooma-Richardsona (2 lub 3),
7. „Meta w węzłach” – obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachowych (tak lub nie),
8. „Inne nowotwory” - czy pacjentka chorowała na nowotwór (także na raka piersi) w przeszłości (tak lub nie),
9. „Rak sutka” - rak piersi w wywiadzie u krewnych I stopnia (tak lub nie),
10. „Nie sutek” - nowotwór inny niż rak sutka w wywiadzie rodzinnym (tak, nie),
11. „Czas” - czas trwania miesiączkowania w latach,
12. „Stan hormonalny” - pacjentka przed menopauzą lub po menopauzie,
13. „Liczba porodów”,
14. „Liczba poronień”,
15. „BMI” - indeks masy ciała.

Tabela XXV przedstawia uzyskane wyniki:

Tabela XXV. Wynik analizy pierwszego modelu Coxa dla OS.

Nazwa zmiennej objaśniającej	Wartość estymatora	Exp (wsp)	Se (wsp)	Z	Wartość p
„ER”	-0,9968	0,3691	0,4138	-2,409	0.0160
„nm23”	1,1201	3,0653	0,8377	1,337	0.1800
„Wiek w latach”	-1,4042	0,2456	1,0348	-1,357	0.1700
„Wielkość guza”	1,3771	3,9634	0,8544	1,612	0.1100
„Stopień UICC”	-3,3323	0,0357	1,5733	-2,118	0.0340
„Stopień wg Blooma”	1,1135	3,0450	1,0134	1,099	0.2700
„Meta w węzłach chłonnych”	5,6389	281,1534	1,9766	2,853	0.0043
„Inne nowotwory”	-0,9932	0,3704	1,3495	-0,736	0.4600
„Rak sutka”	-3,1528	0,0427	2,1511	-1,466	0.1400
„Nie sutek”	-0,2023	0,8168	0,8093	-0,250	0.8000
„Czas”	1,4017	4,0621	0,9973	1,406	0.1600
„Stan hormonalny”	3,0444	20,9981	1,3139	2,317	0.0200
„Liczba porodów”	0,8111	2,2504	0,5396	1,503	0.1300
„Liczba poronień”	-0,8339	0,4344	0,4944	-1,687	0.0920
„BMI”	0,0109	1,0110	0,0765	0,143	0.8900

Opis do tabel XXV, XXVI, XXVII i XXVIII:

Wartość estymatora zawiera oszacowanie wartości parametrów (współczynników) prowadzących do określenia stopnia ryzyka zgonu w zależności od wartości zmiennej objaśniającej.

Exp (wsp) określa względne ryzyko zgonu przy jednostkowej zmianie wartości zmiennej objaśniającej.

Se (wsp) podaje dokładność estymacji poszczególnych współczynników (parametrów).

Z symbolizuje wartość statystyki testowej, jest ilorazem *wartości estymatora* i *Se*, na jego podstawie ocenia się *wartość p*.

Wartość p mówi nam, czy możemy przyjąć hipotezę orzekającą, że faktyczna wartość danego współczynnika jest różna od zera, a zatem czy dana zmienna ma istotny wpływ na ryzyko zgonu.

Na podstawie powyższej analizy można stwierdzić, że ER ($p=0.0160$), stopień zaawansowania klinicznego ($p=0.0340$), obecność przerzutów w węzłach chłonnych ($p=0.0043$) oraz stan hormonalny ($p=0.02$) na tle innych zmiennych

miały zdecydowanie najistotniejszy wpływ na czas życia pacjentek od chwili rozpoznania nowotworu (odpowiadające im współczynniki w modelu regresji Coxa są istotnie różne od zera). Uwagę zwraca fakt, że bliski istotności jest także parametr określający liczbę poronień ($p=0.092$), jednak względnie mała liczba obserwacji przy dużej liczbie zmiennych nie daje przekonującej istotności samego modelu. Standardowe testy istotności „całego” modelu dają wartości p równe:

likelihood ratio test	(test ilorazu wiarygodności)	= 31 on 15 df,	$p=0.00882$
Wald test	(test Walda)	= 15 on 15 df,	$p=0.451$
score (logrank) test	(test logarytmu rang)	= 22,8 on 15 df,	$p=0.0881$

Jak widać, test Walda nie potwierdza istotności powyższego modelu.

Kolejna analiza, bazująca także na modelu Coxa, wykorzystuje metodę Akaike wyboru zmiennych w modelu. Jest to szczególnie uzasadniony tok postępowania w tym przypadku, jako że mamy dużą liczbę zmiennych objaśniających przy względnie małej liczbie obserwacji.

Istota metody Akaike [103] polega na tym, że wybiera ona możliwie najmniejszy zestaw parametrów kliniczno-patologicznych (najmniejszy „prawdziwy” model statystyczny opisujący dane w próbie losowej). Po zastosowaniu ww. metody w modelu zawsze pozostają parametry o największym „wpływie” na badane statystycznie zjawisko. Metoda Akaike jest jednym z najnowocześniejszych wydajnych narzędzi statystycznych o udowodnionej i sprawdzonej skuteczności. Powszechnie stosuje się ją od 1986 roku.

Tabela XXVI opisuje wyniki analizy danych po redukcji liczby zmiennych metodą Akaike.

Tabela XXVI. Wyniki analizy modelu Coxa po jego redukcji metodą Akaike dla OS.

Nazwa zmiennej objaśniającej	Wartość estymatora	Exp (wsp)	Se (wsp)	Z	Wartość p
„ER”	-0,302	0,740	0,139	-2,17	0.0300
„Meta do węzłów”	2,195	8,982	0,687	3,20	0.0014
„Stan hormonalny”	1,712	5,540	0,798	2,15	0.0320
„Liczba poronień”	-0,482	0,618	0,352	-1,37	0.1700

Metodą Akaike zredukowano model do czterech zmiennych objaśniających, które miały największy wpływ na całkowite przeżycie w badanej grupie chorych: przerzuty do węzłów chłonnych ($p=0.0014$), receptor estrogenowy ($p=0.03$), stan hormonalny ($p=0.032$) i liczba poronień ($p=0.17$). Zauważmy, że liczba poronień pozostała w modelu, mimo że odpowiadająca jej wartość „p” nie była mniejsza od 0.05.

Poniżej podane są wyniki testowania istotności tak zredukowanego modelu. Dla wszystkich testów wartości „p” są zdecydowanie poniżej 0.05, co skłania nas do przyjęcia tezy, że jest to model właściwy (a zatem pozostawione w nim parametry kliniczno-patologiczne determinują czas całkowitego przeżycia obserwowanych pacjentek):

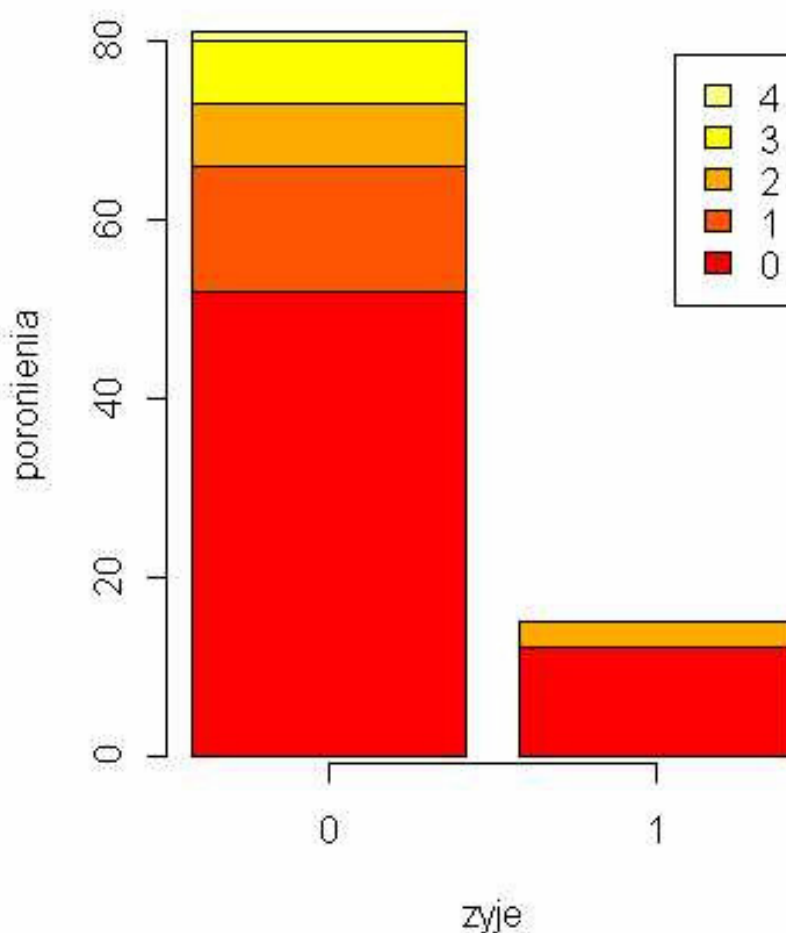
test ilorazu wiarygodności	= 18,1 on 4 df, $p=0.0012$
test Walda	= 14,9 on 4 df, $p=0.00503$
test logarytmu rang	= 16,0 on 4 df, $p=0.00307$

Znamienne jest, że stopień zaawansowania klinicznego nie jest obecny w drugim modelu, mimo iż w pierwszym był obecny z wartością $p=0.0340$. Natomiast zmienna „liczba poronień” jest obecna w drugim „zredukowanym” modelu, mimo że wartość „p” jej odpowiadająca wynosi 0.17.

Aby wyjaśnić taki wynik analizy danych wykonano i przeanalizowano histogramy częstości, graficznie ilustrujące rozkład pacjentek w obrębie poszczególnych badanych zmiennych objaśniających.

Poniższy histogram częstości (Rycina 28) przedstawia rozkład chorych o różnej liczbie poronień w dwóch grupach pacjentek: tych, które zmarły w okresie pięcioletniej obserwacji i tych, które żyły dłużej.

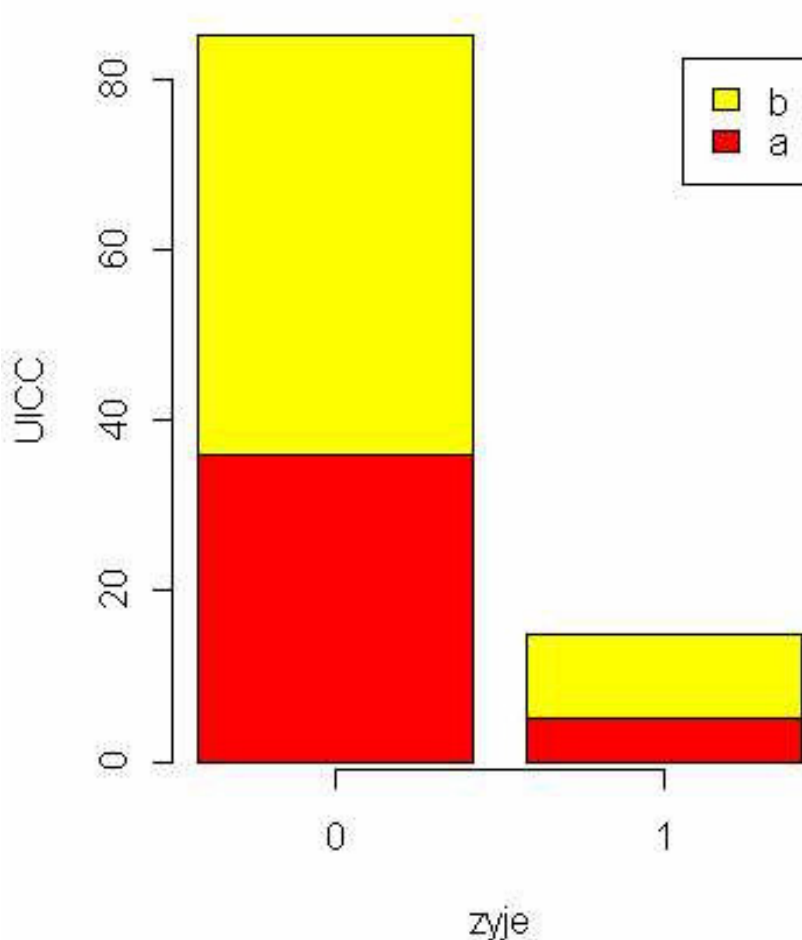
Rycina 28. Histogram obrazujący zależność pomiędzy OS a liczbą poronień.



Wśród pacjentek które zmarły (1) nie było ani jednej, która roniła więcej niż dwa razy. A zatem bardziej zrozumiałą jest fakt pozostawienia tej zmiennej w najmniejszym prawdziwym modelu po zastosowaniu metody Akaike. Jest prawdopodobne, że gdyby liczba obserwowanych pacjentek była większa, wykazano by dla tego parametru klinicznego istotność statystyczną.

Kolejny histogram częstości (Rycina 29) obrazuje zależności pomiędzy stopniem zaawansowania klinicznego a przeżyciem pacjentek.

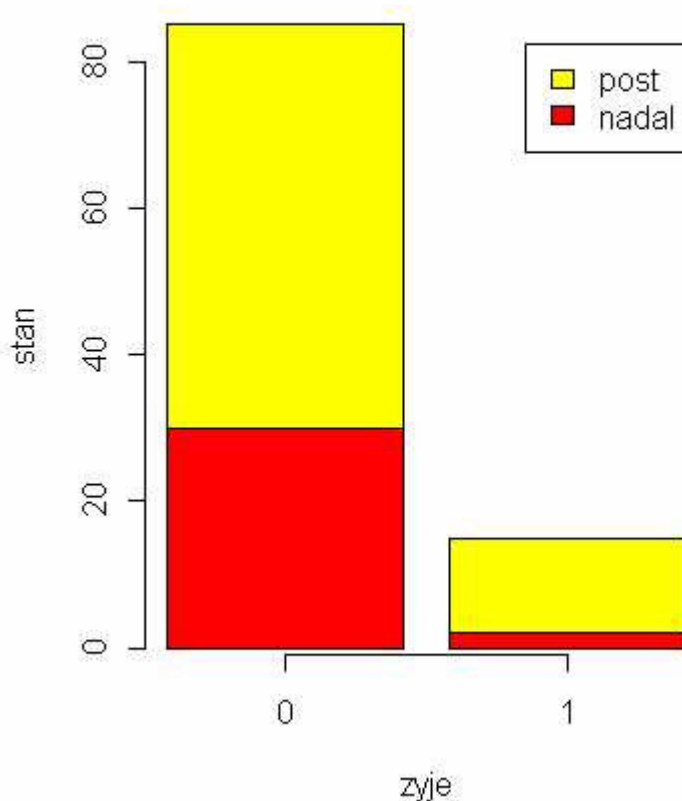
Rycina 29. Histogram obrazujący zależność pomiędzy OS a stopniem zaawansowania klinicznego.



Wyraźnie widoczne jest, że proporcja pacjentek w stopniu zaawansowania IIa i IIb była podobna w obu grupach chorych: tych, które zmarły (1) i tych, które przeżyły (0) graniczny okres 5 lat. Wydaje się więc zrozumiały fakt braku tej zmiennej w „najmniejszym prawdziwym modelu” uzyskanym po zastosowaniu metody Akaike. Nie wykazano rokowniczego znaczenia stopnia zaawansowania klinicznego.

Poniższy histogram częstości (Rycina 30) ilustruje zmienną „stan hormonalny”.

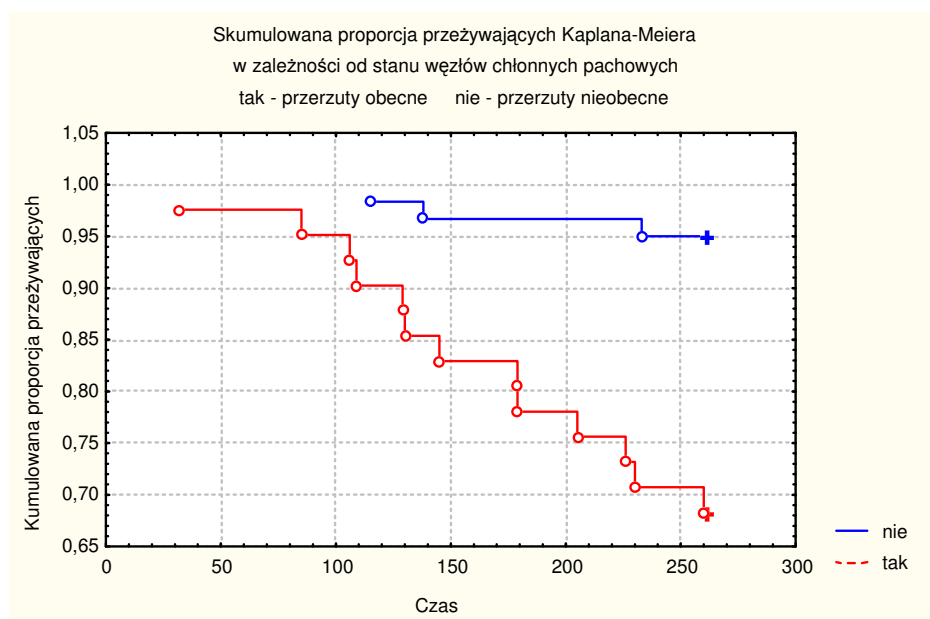
Rycina 30. Histogram obrazujący zależność pomiędzy OS a stanem hormonalnym chorych.



Okazuje się, że w grupie pacjentek, które zmarły znalazło się proporcjonalnie znacznie mniej pacjentek wciąż miesiączkujących. Stąd obecność tej zmiennej w obu modelach. A zatem stan hormonalny był czynnikiem prognostycznym w badanej grupie chorych.

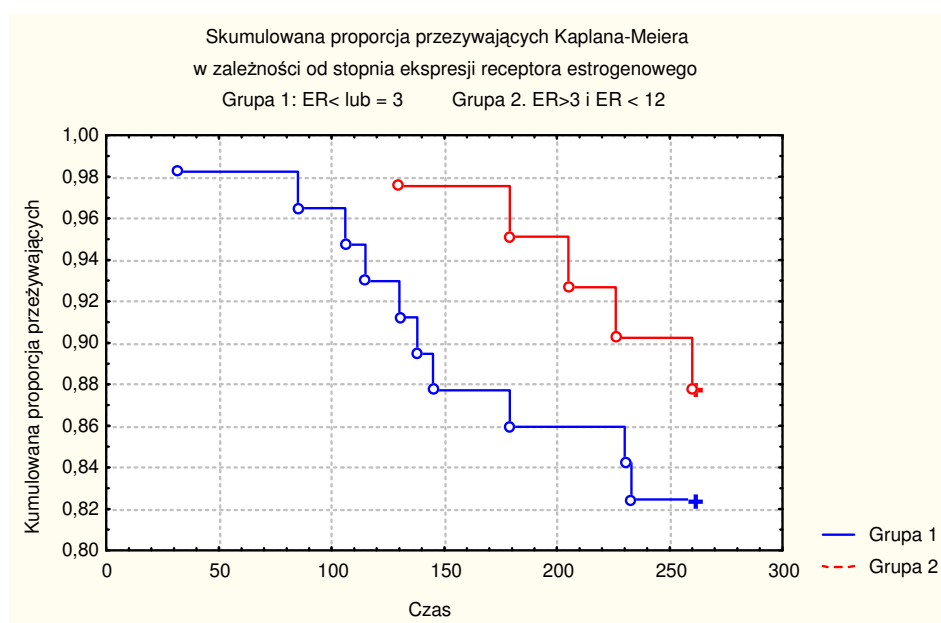
Poniżej przedstawiono estymator Kaplana-Meiera porównujący proporcje przeżycia dla pacjentek o różnym stanie węzłów chłonnych pachowych (Rycina 31). Wyraźnie widoczna jest lepsza prognoza dla grupy chorych bez przerzutów do węzłów chłonnych. Zmienna ta była najsilniejszym czynnikiem rokowniczym spośród wszystkich analizowanych.

Rycina 31. Wykres ilustrujący zależność pomiędzy OS a stanem węzłów chłonnych pachowych.



W podobny sposób (Rycina 32) przedstawiono proporcje przeżycia dla dwóch grup pacjentek o różnym stopniu ekspresji receptora estrogenowego. Receptor estrogenowy ($p=0.03$) był czynnikiem prognostycznym „słabszym” niż stan węzłów chłonnych ($p=0.0014$).

Rycina 32. Wykres ilustrujący zależność pomiędzy OS a nasileniem ekspresji receptora estrogenowego.



Na podstawie przeprowadzonej analizy danych uzyskano następujące wyniki dotyczące pięcioletniego okresu przeżycia badanej grupy chorych:

1. „Najsilniejszym” czynnikiem rokowniczym była obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachowych. Kobiety z tą cechą znajdowały się w grupie ryzyka niemal dziewięciokrotnie większego niż pacjentki, u których przerzutów do węzłów chłonnych pachy nie obserwowano.
2. Receptor estrogenowy był drugim co do istotności czynnikiem prognostycznym.
3. Poziom ekspresji białka nm23 nie był czynnikiem rokowniczym.
4. Kobiety po menopauzie były zdecydowanie bardziej narażone na zgon niż kobiety miesiączkujące.
5. Kobiety, które roniły, miały lepszą prognozę przeżycia (jednak współczynnik regresji nie jest tutaj istotnie różny od zera).
6. W badanej grupie nie wykazano prognostycznego znaczenia następujących zmiennych: wielkość guza w centymetrach, wiek w latach, stopień zaawansowania klinicznego wg UICC, stopień złośliwości histologicznej wg Blooma-Richardsona, czas trwania miesiączkowania w latach, ilość porodów, stan odżywienia wg BMI, dotychczasowy wywiad nowotworowy pacjentek, rak piersi w wywiadzie u krewnych I stopnia, nowotwór inny niż rak sutka w wywiadzie rodzinnym.

WYNIKI ANALIZY STATYSTYCZNEJ CZASU PRZEŻYCIA WOLNEGO OD OBJAWÓW CHOROBY

Analogiczną analizę przeprowadzono dla uwarunkowań dotyczących czasu remisji (DFS). W poniższej tabeli przedstawiono wyniki estymacji dla maksymalnej liczby czynników kliniczno-patologicznych (Tabela XXVII). Pominięto zmienne objaśniające, które w wyniku wstępnego opracowania okazały się nieistotne. Zmienną ciągłą „BMI” zastąpiono zmienną dyskretną „otyłość”. Wzorując się na kryteriach Broca, przyjęto następujące zakresy BMI:

- norma BMI $\leq 24,5$
- nadwaga $25 > \text{BMI} > 24,5$
- otyłość BMI > 30 .

Tabela XXVII. Wynik analizy pierwszego modelu Coxa dla DFS.

Nazwa zmiennej objaśniającej	Wartość estymatora	Exp (wsp)	Se (wsp)	Z	Wartość p
„ER“	-0,5334	0,587	0,215	-2,4814	0.0130 *
„nm23“	1,0087	2,742	0,658	1,5339	0.1300
„wiek“	-0,7539	0,471	0,780	-0,9660	0.3300
„Wielkość guza”	1,2857	3,617	0,605	2,1261	0.0330 *
„UICC”	1,5008	0,223	0,770	1,9503	0.0510 *
„Bloom”	0,2004	1,222	0,681	0,2941	0.7700
„Meta w węzłach”	3,2302	25,284	0,991	3,2603	0.0011 *
„Inne nowotwory”	1,9784	7,231	0,895	2,2093	0.0270 *
„Czas”	-0,0217	0,979	0,698	-0,0310	0.9800
„Stan hormonalny”	2,3751	10,753	0,960	2,4730	0.0130 *
„Liczba porodów”	0,8818	2,415	0,366	2,4071	0.0160 *
„Liczba poronień”	-0,4675	0,627	0,335	-1,3954	0.1600
„Otyłość”	-0,0918	0,912	0,420	-0,2188	0.8300

Następujące wyniki testowania potwierdziły istotność modelu:

test ilorazu wiarygodności	= 35,2 on 13 df,	p=0.000795
test Walda	= 24,1 on 13 df,	p=0.0305
test logarytmu rang	= 32,8 on 13 df,	p=0.00183

Czas remisji - w porównaniu z czasem przeżycia pacjentek - wydawał się być zależny od większej liczby parametrów kliniczno-patologicznych. Receptor estrogenowy (p=0.0130), wielkość guza (p=0.0330), stopień zaawansowania klinicznego (p=0.0510), obecność przerzutów w węzłach chłonnych (p=0.0011), inne nowotwory w wywiadzie (p=0.0270), stan hormonalny (p=0.0130) oraz liczba porodów (p=0.0160) to zmienne, dla których współczynnik regresji był

istotnie różny od zera, czyli miały one istotny wpływ na DFS. Ciekawą obserwacją był fakt, że znaczenie stopnia zaawansowania klinicznego było na granicy istotności ($p=0.0510$), podczas gdy dla zmiennej „wielkość guza” wartość „p” wynosiła 0.0330.

Należy jednak pamiętać, że obserwowana była stosunkowo niewielka grupa pacjentek przy znacznej liczbie zmiennych objaśniających. Dlatego ponownie posłużono się metodą Akaike do redukcji modelu Coxa.

Kolejna tabela przedstawia wyniki estymacji, bazujące także na modelu Coxa po redukcji modelu metodą Akaike (Tabela XXVIII).

Tabela XXVIII. Wyniki analizy modelu Coxa dla DFS po jego redukcji metodą Akaike.

Nazwa zmiennej objaśniającej	Wartość estymatora	Exp (wsp)	Se (wsp)	Z	Wartość p
„ER”	-0,514	0,598	0,167	-3,08	0.0021*
„nm23”	1,187	3,278	0,626	1,90	0.0580
„Wielkość guza”	1,133	3,105	0,566	2,00	0.0450*
„UICC”	1,411	0,244	0,679	2,08	0.0380*
„Meta w węzłach”	3,186	24,184	0,820	3,89	0.0001*
„Inne nowotwory”	2,114	8,280	0,765	2,76	0.0057*
„Stan hormonalny”	1,892	6,633	0,680	2,78	0.0054*
„Liczba porodów”	0,705	2,023	0,283	2,49	0.0130*
„Liczba poronień”	-0,458	0,633	0,312	-1,47	0.1400

Jak widać poniżej, istotność modelu wzrosła znacznie po redukcji liczby uwzględnionych parametrów klinicznych:

test ilorazu wiarygodności	= 33,8 on 9 df,	p=0.000098
test Walda	= 23,6 on 9 df,	p=0.00508
test logarytmu rang	= 27,7 on 9 df,	p=0.00108

Można było zauważyć, że redukcja liczby zmiennych w modelu Coxa wzmacnia wyniki otrzymane przy większym modelu. Na podstawie przeprowadzonej

analizy danych uzyskano następujące wyniki dotyczące czasu przeżycia wolnego od objawów choroby w obserwowanej grupie chorych:

1. Wpływ ER był podobny jak w przypadku badania czasu przeżycia pacjentek: wraz ze wzrostem ekspresji receptora estrogenowego przedłużał się okres wolny od objawów choroby.
2. Obecność przerzutów do węzłów chłonnych ponownie okazała się najważniejszym czynnikiem, który skracał DFS.
3. Wraz ze wzrostem wielkości guza, stopnia zaawansowania i ilości porodów zwiększało się ryzyko nawrotu choroby.
4. Pacjentki, które chorowały w przeszłości na nowotwory złośliwe, jak również chore niemiesiączkujące, charakteryzowały się krótszym DFS.
5. Wpływ nm23 ($p=0.0580$) był bliski istotności, a wzrost nasilenia jego ekspresji skracał czas remisji.
6. Większa liczba poronień pozostała w modelu, pomimo że nie była czynnikiem istotnym statystycznie ($p=0.14$). Nie można więc przy tej liczbie obserwacji postawić tezy, że zmniejsza ona ryzyko nawrotu choroby.
7. Spośród analizowanych zmiennych wiek, stopień złośliwości, czas trwania okresu miesiączkowania oraz stan odżywienia nie wykazywały znamiennej statystycznie wpływu na czas remisji w obserwowanej grupie chorych na raka piersi.

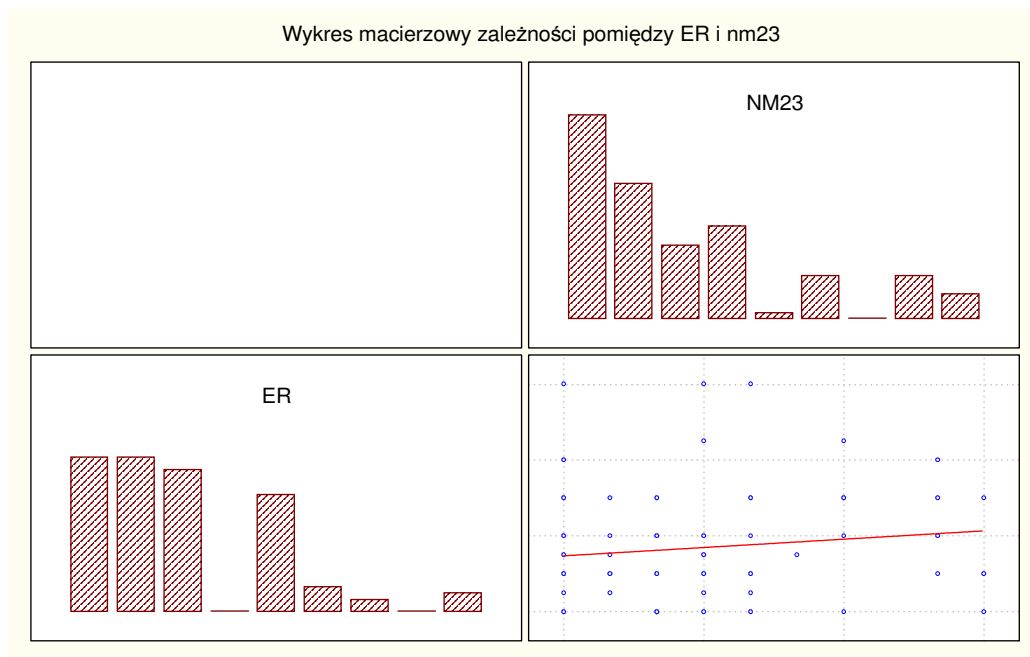
ANALIZA ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY RECEPTOREM ESTROGENOWYM A WYBRANYMI PARAMETRAMI KLINICZNYMI

W pierwszym etapie analizy zbadano zależność pomiędzy stopniem ekspresji ER i nm23. Do oceny korelacji pomiędzy tymi parametrami posłużono się współczynnikami korelacji rang Spearmana i Kendalla [50] (zweryfikowano hipotezę o zerowości współczynników korelacji Kendalla i Spearmana dla rang):

Wartość współczynnika korelacji rang Kendalla $\tau=0.08252$	$p=0.2286$
Wartość współczynnika korelacji rang Spearmana $\rho=0.1094$	$p=0.2832$

Rycina 33 obrazuje stopień zależności pomiędzy testowanymi markerami.

Rycina 33. Wykres ilustrujący zależność pomiędzy ekspresją ER i nm23.



Wynik testowania nie wykazał korelacji pomiędzy zmiennymi ER i nm23.

Kolejnym etapem mojej pracy była analiza zależności pomiędzy stopniem ekspresji receptora estrogenowego i następującymi zmiennymi o charakterze dyskretnym: „UICC”, „Bloom”, „meta”, „inne”, „raks”, „nies”, „stan”, „rodziła”, „roniła”, „otyłość”, „leczenie” i „wznowa”. Ze względu na dyskretny charakter zmiennych i brak normalności rozkładów zastosowano tutaj test Kruskala-Wallisa (nieparametryczny odpowiednik jednokierunkowej analizy wariancji dla weryfikacji hipotezy o równości wartości średnich w kilku populacjach) [50].

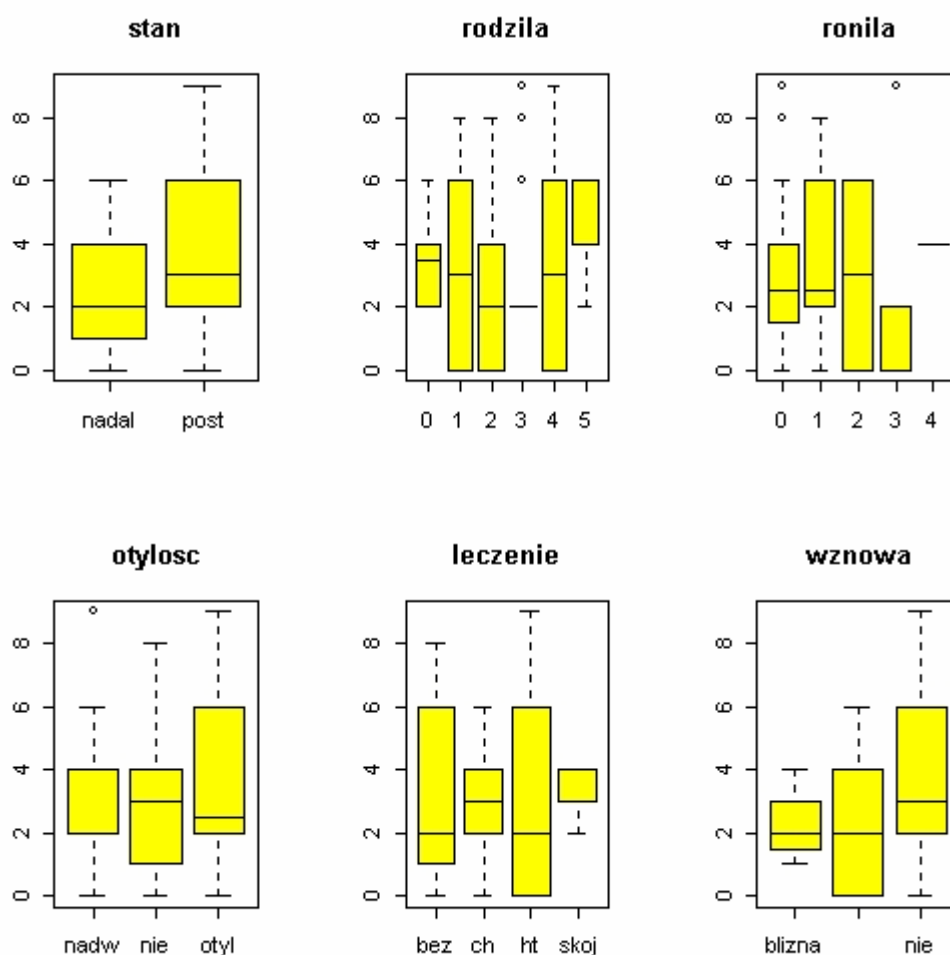
Poniżej przedstawiono wyniki testowania poszczególnych zmiennych:

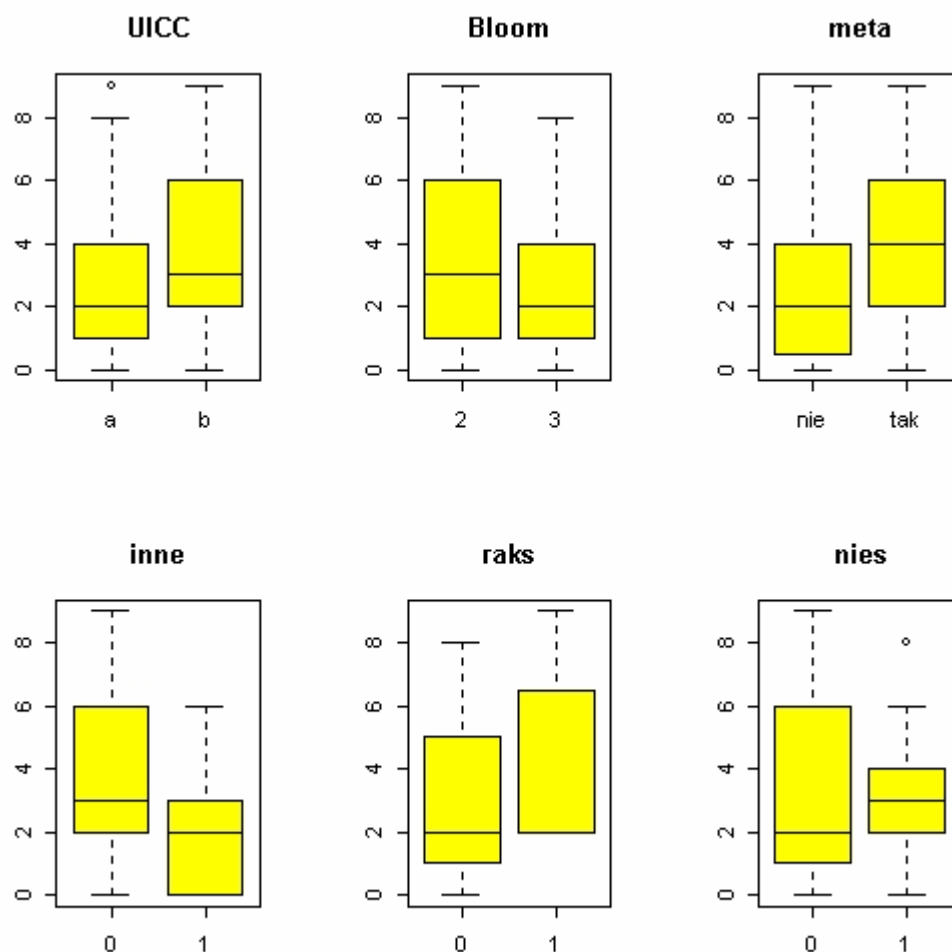
"UICC" - stopień zaawansowania klinicznego (2a lub 2b) wartość statystyki Kruskala-Wallisa (χ^2) = 0.0952 stopnie swobody (df) = 1		p = 0.7577
"Bloom" - stopień złośliwości histologicznej wg Blooma-Richardsona (2 lub 3) wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 1.352	df = 1	p = 0.2449
"meta" - obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachowych (tak lub nie) wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 3.3596	df = 1	p = 0.06681
"inne" - inne nowotwory w wywiadzie wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 1.7517	df = 1	p = 0.1857
"raks" - rak piersi w wywiadzie u krewnych I stopnia (tak lub nie) wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 0.8621	df = 1	p = 0.3532
"nies"- nowotwór inny niż rak sutka w wywiadzie rodzinnym (tak, nie) wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 0.181	df = 1	p = 0.6705
"stan" - stan hormonalny wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 1.9994	df = 1	p = 0.1574
"rodziła"- liczba porodów wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 3.0876	df = 5	p = 0.6865
"roniła"- liczba poronień wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 1.4147	df = 4	p = 0.8416
"otyłość" – stan odżywienia (nadwaga, otyłość i w normie) wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 0.5082	df = 2	p = 0.7756
"leczenie" – rodzaj zastosowanego leczenia (chemioterapia, hormonoterapia, skojarzone, bez leczenia uzupełniającego) wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 0.5505	df = 3	p = 0.9077
"wznowa" – rodzaj nawrotu (wznowa miejscowa w bliźnie, przerzuty odległe, bez objawów nawrotu) wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 1.0525	df = 2	p = 0.5908

Testy nie wykazały związku pomiędzy wyżej wymienionymi zmiennymi i wartościami ER. Jedynie dla zmiennej „meta” (p = 0.06681) otrzymano wartość „p” poniżej poziomu 0.1. Należy tutaj uwzględnić fakt, że mała liczba wcześniej zmarłych pacjentek osłabiła moc zastosowanych testów.

Poniżej, dla lepszej orientacji w skali różnic pomiędzy wartościami ER w poszczególnych grupach, przedstawione są wykresy pudełkowe (Rycina 34) odpowiadające testowanym parametrom kliniczno-patologicznym.

Rycina 34. Wykresy pudełkowe ilustrujące zależność pomiędzy ER i zmiennymi dyskretnymi. Poziom ekspresji receptora estrogenowego znajduje się na osi pionowej.





Poprzez analizę korelacji zbadano także zależność pomiędzy znacznikiem ER i zmiennymi o charakterze ciągłym: „wiek”, „guz”, „czas”, „BMI”. Do oceny korelacji pomiędzy tymi parametrami posłużono się współczynnikami korelacji rang Spearmana i Kendalla (zweryfikowana została hipoteza o zerowości współczynników korelacji Kendalla i Spearmana dla rang) [50]. Współczynniki te są nieparametrycznymi odpowiednikami współczynnika korelacji Pearsona. Współczynnik korelacji Pearsona ma tutaj nikłe zastosowanie ze względu na brak normalności rozkładu zmiennej ER.

"wiek" – wiek chorej w latach

współczynnik korelacji rang Kendalla tau

wartość statystyki testowej $z.\tau = 1.4994$ $p = 0.1338$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika tau nie jest równa 0

estymator tau = 0.102782

współczynnik korelacji rang Spearmana rho

wartość statystyki testowej $S = 135128$ $p = 0.1736$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika rho nie jest równa 0

estymator rho = 0.1384833

"guz" – wielkość guza w cm

współczynnik korelacji rang Kendalla tau

wartość statystyki testowej $z.\tau = -0.6119$ $p = 0.5406$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika tau nie jest równa 0

estymator tau = 0.04194252

współczynnik korelacji rang Spearmana rho

wartość statystyki testowej $S = 165299$ $p = 0.5977$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika rho nie jest równa 0

estymator rho = 0.05387649

"czas" – czas trwania miesięczkowania w latach

współczynnik korelacji rang Kendalla tau

wartość statystyki testowej $z.\tau = 0.1983$ $p = 0.8428$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika tau nie jest równa 0

estymator tau = 0.01359606

współczynnik korelacji rang Spearmana rho

wartość statystyki testowej $S = 153575$ $p = 0.838$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika rho nie jest równa 0

estymator rho = 0.02087099

"BMI" – indeks masy ciała

współczynnik korelacji rang Kendalla tau

wartość statystyki testowej $z.\tau = 0.7576$ $p = 0.4487$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika tau nie jest równa 0

estymator tau = 0.05808907

współczynnik korelacji rang Spearmana rho

wartość statystyki testowej $S = 75079$ $p = 0.4493$

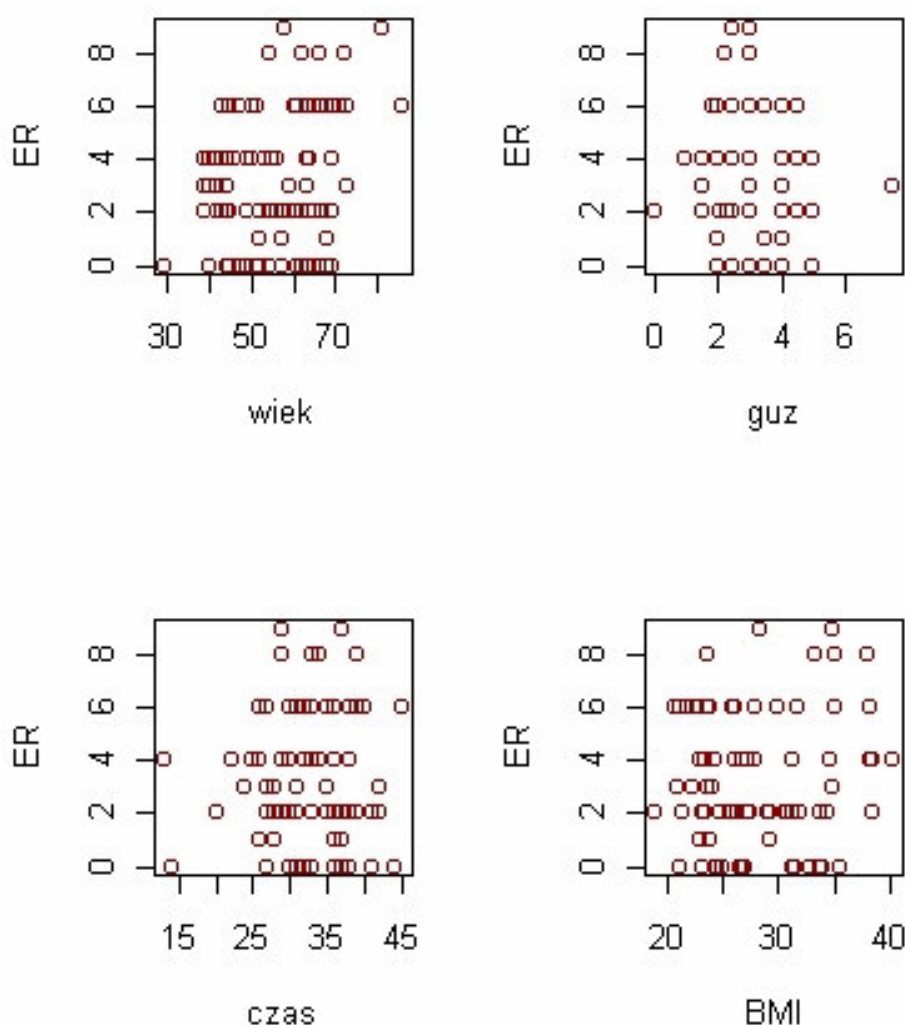
alternatywna hipoteza: wartość współczynnika rho nie jest równa 0

estymator rho = 0.08618478

Najsilniejszą korelację ($p = 0.1338$ oraz $p = 0.1736$) zaobserwowano pomiędzy wiekiem i ER, ale i tutaj wartość „p” związana z testowaniem zerowości współczynnika była większa niż 0.1.

Wykresy punktowe, zamieszczone poniżej (Rycina 35), dają wyobrażenie o skali zależności pomiędzy zmiennymi.

Rycina 35. Wykresy punktowe ilustrujące zależność pomiędzy nasileniem ekspresji ER i zmiennymi typu ciągłego.



Na podstawie przeprowadzonej analizy danych uzyskano następujące wyniki dotyczące obserwowanej grupy chorych oraz zależności pomiędzy ER a innymi parametrami klinicznymi:

1. Nie wykazano zależności pomiędzy nasileniem ekspresji ER i nm23-H1.
2. Nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją receptora estrogenowego wg IRS a testowanymi szesnastoma parametrami kliniczno-patologicznymi.

ANALIZA ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY NASILENIEM EKSPRESJI BIAŁKA nm23-H1 A WYBRANYMI PARAMETRAMI KLINICZNYMI

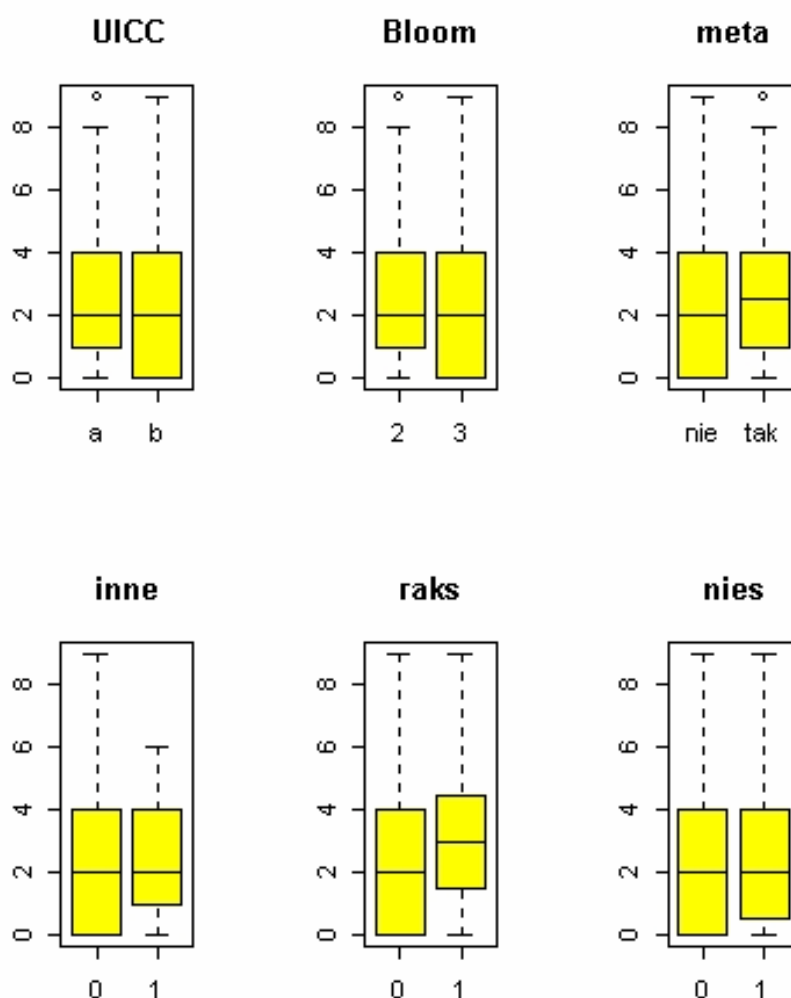
Następujące wyniki dotyczą analizy zależności pomiędzy białkiem nm23 i zmiennymi typu dyskretnego: „UICC”, „Bloom”, „meta”, „inne”, „raks”, „nies”, „stan”, „rodziła”, „roniła”, „otyłość”, „leczenie” i „wznowa”. Analiza ta została przeprowadzona analogicznie jak w przypadku znacznika ER. Zastosowano tutaj także test Kruskala Wallisa [50]. Wyniki testowania zamieszczono poniżej:

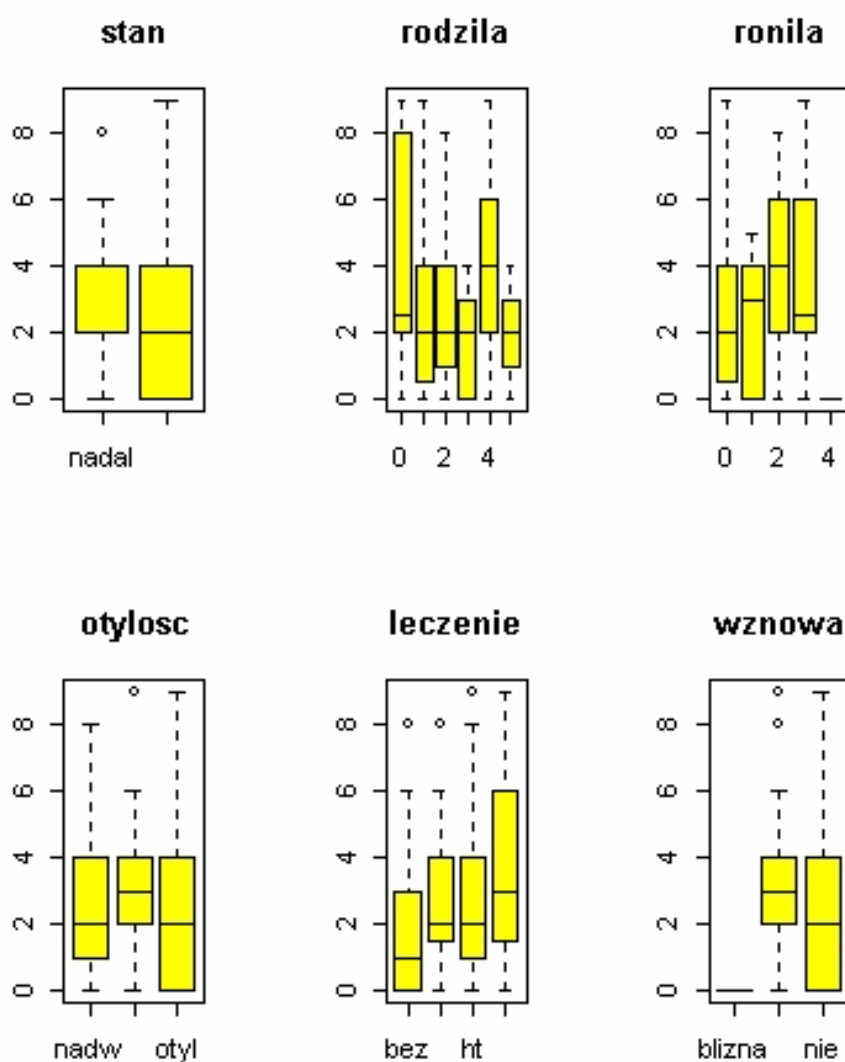
"UICC"- stopień zaawansowania klinicznego (2a lub 2b)		
wartość statystyki Kruskala-Wallisa (χ^2) = 0.6316		
stopnie swobody (df) = 1		p = 0.4268
"Bloom" - stopień złośliwości histologicznej wg Blooma-Richardsona (2 lub 3)		
wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 0.0021	df = 1,	p = 0.9631
"meta" - obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachowych (tak lub nie)		
wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 0.8185	df = 1	p = 0.3656
"inne" - inne nowotwory w wywiadzie		
wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 0.0595	df = 1	p = 0.8072
"raks" - rak piersi w wywiadzie u krewnych I stopnia (tak lub nie)		
wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 0.3071	df = 1	p = 0.5795
"nies" - nowotwór inny niż rak sutka w wywiadzie rodzinnym (tak lub nie)		
wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 0.0078	df = 1	p = 0.9297
"stan" - stan hormonalny		
wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 0.1893	df = 1	p = 0.6635
"rodziła" - liczba porodów		
wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 5.7051	df = 5	p = 0.336
"roniła" - liczba poronień		
wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 4.2122	df = 4	p = 0.3781
"otyłość" - stan odżywienia wg Broca		
wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 1.5277	df = 2	p = 0.4659
"leczenie" - rodzaj zastosowanego leczenia (chemioterapia, hormonoterapia, skojarzone, bez leczenia uzupełniającego)		
wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 2.5924	df = 3	p = 0.4588
"wznowa" - rodzaj nawrotu (wznowa miejscowa w bliźnie, przerzuty odległe, bez objawów nawrotu)		
wartość testu Kruskala-Wallisa χ^2 = 6.6122	df = 2	p = 0.03666

Testy w większości przypadków nie wykazały wpływu poszczególnych parametrów klinicznych na wartość nm23. Jedynie dla zmiennej „wznowa” różnice w poszczególnych grupach były istotne statystycznie ($p = 0.03666$).

Poniżej przedstawione są wykresy pudełkowe (Rycina 36), informujące o skali różnic pomiędzy wartościami nm23 w poszczególnych grupach. Wartość ekspresji białka nm23 reprezentowana jest na osi pionowej. Okazuje się, że w badanej grupie pacjentek wraz ze wzrostem poziomu ekspresji białka nm23 wg IRS zwiększało się ryzyko odległego nawrotu choroby nowotworowej. Jest to obserwacja zgodna z uzyskanymi poprzednio wynikami analizy Coxa i Akaike dla czynników wpływających na czas przeżycia bez objawów choroby.

Rycina 36. Wykresy pudełkowe ilustrujące zależność pomiędzy białkiem nm23-H1 i zmiennymi dyskretnymi. Poziom ekspresji nm23 znajduje się na osi pionowej.





Poprzez analizę korelacji rang, zbadano także zależność pomiędzy stopniem ekspresji nm23 wg IRS i zmiennymi o charakterze ciągłym: „wiek”, „guz”, „czas” i „BMI”. Do oceny korelacji pomiędzy tymi parametrami posłużono się współczynnikami korelacji rang Spearmana i Kendalla (zweryfikowana została hipoteza o zerowości współczynników korelacji Kendalla i Spearmana dla rang) [50]. Najsilniejszą korelację zaobserwowano w przypadku zmiennej „guz” (dla testu Kendalla wartość $p=0.06461$).

"wiek" – wiek chorej w latach

współczynnik korelacji rang Kendalla tau

wartość statystyki testowej $z.\tau = -0.7989$ $p = 0.4244$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika tau nie jest równa 0

estymator tau = -0.05476177

współczynnik korelacji rang Spearmana rho

wartość statystyki testowej $S = 170464$ $p = 0.3948$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika rho nie jest równa 0

estymator rho = 0.08680555

"guz" – wielkość guza

współczynnik korelacji rang Kendalla tau

wartość statystyki testowej $z.\tau = -1.8479$ $p = 0.06461$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika tau nie jest równa 0

estymator tau = -0.1266709

współczynnik korelacji rang Spearmana rho

wartość statystyki testowej $S = 181713$ $p = 0.1189$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika rho nie jest równa 0

estymator rho = -0.1585224

"czas" – czas trwania miesięczkowania w latach

współczynnik korelacji rang Kendalla tau

wartość statystyki testowej $z.\tau = -1.0151$ $p = 0.3101$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika tau nie jest równa 0

estymator tau = -0.06957973

współczynnik korelacji rang Spearmana rho

wartość statystyki testowej $S = 169698$ $p = 0.422$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika rho nie jest równa 0

estymator rho = -0.08192354

"BMI" – indeks masy ciała

współczynnik korelacji rang Kendalla tau

wartość statystyki testowej $z.\tau = -0.8988$ $p = 0.3687$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika tau nie jest równa 0

estymator tau = -0.06891397

współczynnik korelacji rang Spearmana rho

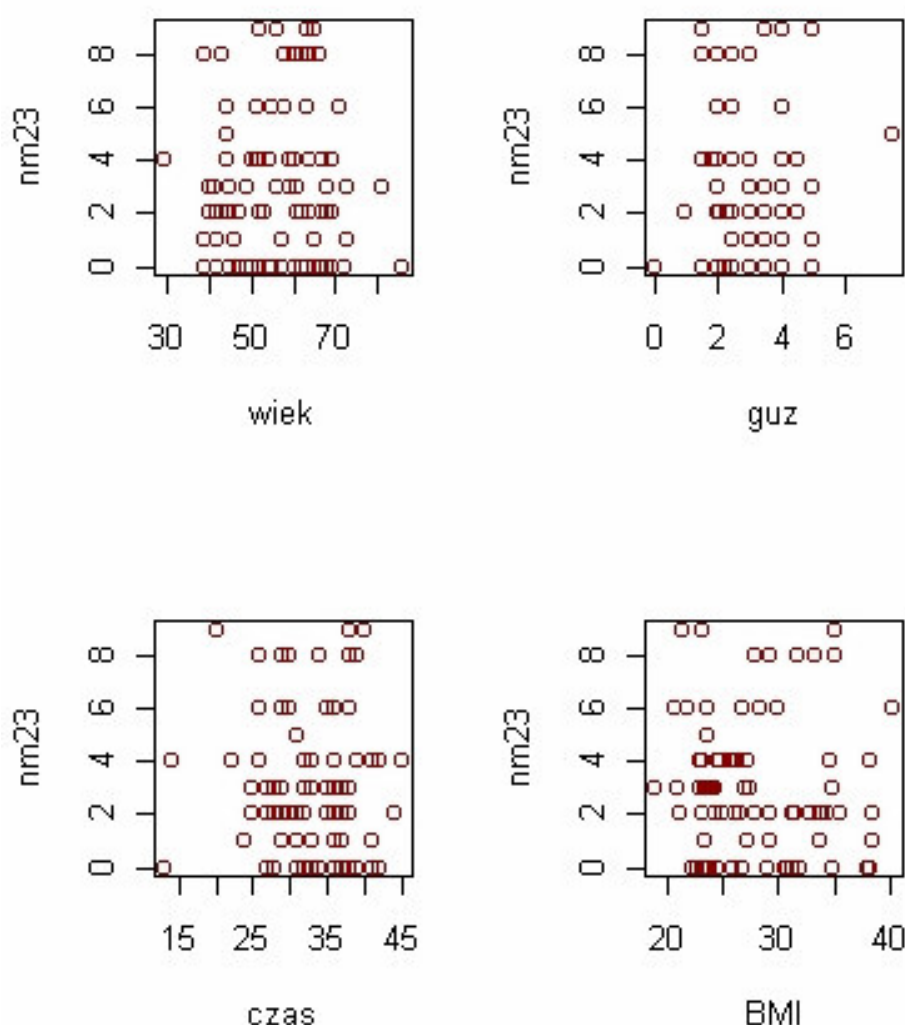
wartość statystyki testowej $S = 90674$ $p = 0.3627$

alternatywna hipoteza: wartość współczynnika rho nie jest równa 0

estymator rho = -0.1036389

Wykresy punktowe zamieszczone poniżej (Rycina 37) ilustrują brak zależności pomiędzy zmiennymi.

Rycina 37. Wykresy punktowe ilustrujące zależność pomiędzy nasileniem ekspresji białka nm23-H1 i zmiennymi typu ciągłego.



Na podstawie przeprowadzonej analizy danych uzyskano następujące wyniki dotyczące zależności pomiędzy nasileniem ekspresji białka nm23 a innymi parametrami klinicznymi w obserwowanej grupie chorych:

1. W większości przypadków (dla 14 testowanych zmiennych) nie wykazano ich związku z ekspresją białka nm23.
2. Wraz ze wzrostem nasilenia ekspresji białka nm23 zwiększało się ryzyko nawrotu odległego choroby nowotworowej.
3. Zaobserwowano nieznamienną statystycznie tendencję do występowania niskich poziomów nm23 w dużych guzach.

DYSKUSJA

Estrogeny działają poprzez regulację ekspresji swoistych genów w komórkach tkanek docelowych. Gromadzenie się estrogenów w niektórych tkankach zostało po raz pierwszy stwierdzone w 1959 r. przez Glasscocka i wsp. [34]. Korenman i wsp. w 1969 r. zaobserwowali szczególnie duże nagromadzenie białek wiążących estrogeny w cytozolu guzów nowotworowych piersi w stosunku do niezmienionych tkanek tego gruczołu lub jego tkanki tłuszczowej [63].

Receptor estrogenowy (ER) jest białkiem-dimerem o masie 67 kDa. Zlokalizowany w cytoplazmie receptor estrogenowy wiąże lipofilne hormony steroidowe po ich wnikięciu do komórki, a następnie przemieszcza się do jądra komórkowego. Związanie hormonu z receptorem powoduje aktywację receptora, co umożliwia mu wiązanie z DNA i (po aktywacji genów) syntezę białek. Następnie receptor dysocjuje z kompleksu i powraca do cytoplazmy. Produkowane białka mogą mieć funkcję strukturalną, receptorową, transportową lub enzymatyczną i pełnią rolę w regulacji wielu procesów metabolicznych [69, 131]. Uważa się, że receptor estrogenowy w raku piersi stanowi wskaźnik zróżnicowania guza i jego zdolności proliferacyjnej [79].

Wygodną, powtarzalną, tanią i obecnie powszechnie stosowaną metodą oznaczania receptorów estrogenowych jest metoda immunohistochemiczna [38, 94].

Jednym z pierwszych doniesień, wykazujących krótszy czas do nawrotu choroby u pacjentek z guzami nie wykazującymi ekspresji receptora

estrogenowego (ER-), była publikacja Knighta i wsp. z 1977 r. analizująca losy 145 chorych z rakiem piersi [60]. Od tego czasu pojawiły się liczne, rozbieżne w swoich przesłaniach, publikacje analizujące prognostyczne znaczenie receptora estrogenowego w raku piersi. Jednak obecnie receptor estrogenowy jest uznanym czynnikiem prognostycznym i predykcyjnym, choć wielu autorów nadal kwestionuje jego znaczenie.

W 1988 r. Patricia S. Steeg i wsp. [115] opisali w *Journal of the National Cancer Institute* nieznanego wcześniej gen nazwany nm23 (non metastatic), zidentyfikowany w dwóch nowotworach eksperymentalnych: komórkach czerniaka K-1735 i raka sutka myszy, wyindukowanego N-nitroso-N-metylomocznikiem. Zaobserwowano, że poziom nm23 RNA jest wysoki w dwóch liniach komórkowych guzów o niskim potencjale przerzutowania (w porównaniu z niską ekspresją w 5 przerzutujących) i nie było to związane z odpowiedzią immunologiczną zwierząt doświadczalnych, lecz z genetycznie uwarunkowaną wewnętrzną agresywnością poszczególnych linii komórkowych nowotworu. Spostrzeżenie to potwierdziło się poprzez zidentyfikowanie znacznych ilości nm23 RNA w normalnych tkankach m. in. w wątrobie, płucach i mięśniach doświadczalnych myszy. Zaobserwowano, że wśród poszczególnych klonów o podobnie wysokiej aktywności przerzutowania istnieją duże różnice w poziomie ekspresji badanego genu, co potwierdza hipotezę o wielogenowej i dodatkowo epigenetycznie uwarunkowanej ostatecznej zdolności nowotworów do wytwarzania przerzutów. Również transfekcja nm23-H1 DNA do układów doświadczalnych komórek czerniaka myszy K-1735 o dużym potencjale przerzutowania powodowała zmniejszoną skłonność do formowania guzów pierwotnych i znaczne zmniejszenie częstości tworzenia przerzutów odległych u atymicznych myszy [73]. Odkrycia te spowodowały duże zainteresowanie genem nm23 i jego białkowymi produktami jako potencjalnymi czynnikami odpowiedzialnymi za zdolność nowotworów do przerzutowania.

Dotychczas zidentyfikowano dwie odmiany genu nm23: nm23-H1 i nm23-H2. Oba kodują białka o masie 17 kDa, identyczne w swoich sekwencjach aminokwasowych w 88% - dwufosforanowe kinazy nukleozydowe (NDP-K, NDP-kinazy). Najprawdopodobniej to właśnie stopień ekspresji genu nm23-H1

jest związany ze zdolnością do przerzutowania badanych nowotworów [123]. Mechanizm działania nm23 nie jest znany, lecz zapewne związany z inhibicją procesu przerzutowania. NDP-kinazy są zaangażowane w polimeryzację mikrotubuli, w regulację G-proteiny i w syntezę trójfosforów nukleozydowych innych niż ATP.

Ponieważ ocena ekspresji RNA związana jest z bardzo skomplikowanymi technikami jego oznaczania w materiale tkankowym, w wielu badaniach oznacza się białkowy produkt genu nm23-H1. Immunohistochemiczne oznaczanie NDP-K wydaje się być szczególnie wartościowe w raku piersi u człowieka, zwłaszcza gdy guz jest mały i do dyspozycji pozostaje niewielka ilość materiału tkankowego [101].

W jednej z pierwszych tego typu prac Barnes i wsp. [4] badali w reakcji immunohistochemicznej preparaty parafinowe ze zdrowej tkanki gruczołu piersiowego, z raka wewnątrzprzewodowego i z inwazyjnego przewodowego raka piersi przy użyciu króliczych przeciwciał przeciwko białkom nm23. Stwierdzono intensywne wybarwienie preparatów ze zdrowych tkanek i mniejszą, lecz wciąż intensywną, reakcję w przypadku raka wewnątrzprzewodowego. W 39 preparatach inwazyjnego raka przewodowego ilość NDP-kinaz była heterogenna i wiele guzów zawierało obszary o bardzo niskiej ich ekspresji. Wykazano, że obok stanu węzłów chłonnych stopień ekspresji NDP-K był niezależnym czynnikiem prognostycznym i potwierdzono związek niskiej ekspresji ze skróceniem czasu przeżycia pacjentek.

Inne wyniki uzyskali Russel i wsp.: nie wykazano w tych badaniach związku pomiędzy stopniem ekspresji białka nm23-H1 a czasem nawrotu choroby oraz przeżyciem całkowitym u 40 chorych na raka piersi bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych. Ci sami autorzy stwierdzili jednak odwrotną korelację pomiędzy stopniem ekspresji genu nm23 a skłonnością do przerzutowania trzech linii komórkowych oraz przeszczepów ksenogenicznych komórek ludzkiego raka piersi u myszy [101].

W innych badaniach doświadczalnych obserwowano zwiększony potencjał przerzutowania linii komórkowych nowotworów myszy przy wysokich poziomach ekspresji nm23 [82].

Te niespójne, ale i obiecujące doświadczenia sprowokowały liczne prace mające na celu wyjaśnienie roli genu nm23 i jego białkowych produktów w procesie przerzutowania i ustalenie ich rokowniczego znaczenia.

Najważniejszym celem niniejszego badania była ocena rokowniczego znaczenia ekspresji receptora estrogenowego i białka nm23-H1. W analizie statystycznej danych, dotyczących wpływu poszczególnych czynników na przeżycie, autor posłużył się bardzo nowoczesnym i skutecznym narzędziem, jakim jest analiza Coxa wykorzystująca metodę Akaike do wyboru zmiennych w modelu statystycznym. Stworzono w tym celu dwa oddzielne modele:

- jeden, do analizy całkowitego czasu przeżycia (OS),
- drugi, dla oceny czasu przeżycia wolnego od objawów choroby (DFS).

Przeprowadzona analiza wykazała, że ekspresja ER jest niezależnym czynnikiem rokowniczym wpływającym na całkowity czas przeżycia i czas wolny od objawów choroby nowotworowej u chorych po leczeniu raka sutka.

Szeroki przegląd literatury potwierdza te wyniki. W pracy S. Grodeckiej-Gazdeckiej, opisującej 302 pacjentki z rakiem piersi bez przerzutów do węzłów chłonnych, stwierdzono istnienie silnego związku pomiędzy ekspresją ER a całkowitym czasem przeżycia w analizie jednoczynnikowej [40]. Z kolei McGuire udowodnił 8-10% różnicę w czasie wolnym od objawów choroby na korzyść chorych z receptorem estrogenowym obecnym w guzie nowotworowym [79]. Silvestrini i wsp. w badaniu 1800 pacjentek stwierdzili w analizie wieloczynnikowej niezależne znaczenie prognostyczne ER, zarówno dla DSF, jak i OS [110]. Seria innych badań potwierdza ww. obserwacje:

- Blamey i wsp. (250 pacjentek N+ i N-) [7],
- Williams i wsp. (badano 704 pacjentki N+ i N-, które nie były leczone uzupełniając do czasu wystąpienia wznowy) [130],
- Stewart i wsp. (278 chorych we wszystkich stopniach zaawansowania choroby) [117],
- Paterson i wsp. (obserwowano 3084 pacjentki we wszystkich stopniach zaawansowania) [93],
- Pertschuk i wsp. (600 chorych we wszystkich stopniach zaawansowania choroby) [94],

- Samaan i wsp. (217 pacjentek N+ i N-) [104],
- Sawan i wsp. [107],
- Ostrowski i wsp. [91].

Istnieją jednak prace, które nie potwierdzają tych doniesień: nie wykazano w nich prognostycznego znaczenia ekspresji receptora estrogenowego w raku piersi:

- Heimann i wsp. (168 pacjentek leczonych jedynie chirurgicznie, bez przerzutów do węzłów chłonnych) [43],
- Maki i wsp. (badano 109 chorych bez przerzutów do węzłów chłonnych) [76],
- Merkle i wsp. (obserwowano 660 pacjentek o różnym stanie węzłów chłonnych) [80],
- Caldarola i wsp. (obserwowano 208 pacjentek N+ i N- w pierwszym badaniu i 680 chorych w kolejnym badaniu) [9, 10],
- Skinner i wsp. (104 chore N+ i N-) [83].

Wyniki badań są wprawdzie rozbieżne, lecz większość ekspertów skłania się do uznania receptora estrogenowego za niezależny czynnik rokowniczy (konsensus konferencji w St.Gallen, gdzie ER uznano za czynnik prognostyczny u chorych bez przerzutów do węzłów chłonnych).

Obserwacje dotyczące lokalizacji przerzutów i czasu przeżycia od momentu rozpoznania uogólnienia choroby zdają się potwierdzać taką interpretację wyników analiz. W licznych badaniach zaobserwowano, że ekspresja receptora estrogenowego w zasadniczy sposób wpływa na lokalizację przerzutów raka piersi. Stwierdzono, że u chorych z obecnością receptora estrogenowego w guzie pierwotnym przerzuty częściej występują w kościach, natomiast rzadziej w narządach miękkich i mózgu [62, 95, 104, 117]. Zaobserwowane różnice wynikały wyłącznie z ekspresji ER, zaś analiza wieloczynnikowa wykazała, że na te różnice nie wpływał żaden z pozostałych badanych czynników: receptor progesteronowy, wiek, stan węzłów chłonnych, DFS, stan hormonalny oraz rodzaj zastosowanego leczenia uzupełniającego (!) [62]. U chorych z przerzutami do narządów miękkich obserwowano krótszy czas przeżycia od momentu rozpoznania rozsiewu w stosunku do tych z przerzutami do kości lub tkanek

miękkich (mediana 16 w stosunku do 34 i 41 miesięcy) [61, 117]. Analiza wielowariantowa potwierdziła w tym przypadku wpływ ER, ale również znaczenie stanu węzłów chłonnych w momencie rozpoznania [61]. Z kolei praca Patersona i wsp. wykazała w tej sytuacji klinicznej wyłączny wpływ ekspresji receptora estrogenowego [93].

Z przeprowadzonej w moim badaniu analizy wieloczynnikowej wynika ponadto, że nasilenie ekspresji białka nm23-H1, mierzone w skali IRS, nie jest niezależnym czynnikiem prognostycznym. Nie zaobserwowano związku pomiędzy nm23 a całkowitym czasem przeżycia. Podobne wyniki uzyskało wielu innych autorów:

- Russel i wsp. przeprowadzili badanie kliniczno-kontrolne na 40 pacjentkach, u których oznaczano immunohistochemicznie białko nm23-H1 w skrawkach parafinowych [101],
- natomiast Charpin i wsp. oznaczali białko nm23H1 w skrawkach mrożonych raka piersi u 168 pacjentek, używając niezwykle dopracowanej i precyzyjnej zautomatyzowanej techniki Ventana i Samba [13].

Sawan i wsp. w badaniu immunohistochemicznym, przeprowadzonym na 197 preparatach raka piersi, również nie wykazali prognostycznego znaczenia białka nm23 oraz wpływu na czas wolny od objawów choroby, zarówno w całej grupie, jak i po podzieleniu chorych na podgrupy z niezmienionymi lub zajęтыми przez przerzuty pachowymi węzłami chłonnymi [107]. Podobne obserwacje przytacza Kapranos i wsp. po dziesięcioletniej obserwacji jednorodnej grupy 44 chorych na raka piersi bez przerzutów do węzłów chłonnych [58].

Powyższe obserwacje stoją w sprzeczności z wynikami badań wskazującymi na dobre rokowanie w przypadku guzów o wysokiej ekspresji nm23: Barnes i wsp. w badaniu immunohistochemicznym przeprowadzonym na 39 preparatach inwazyjnego raka przewodowego wykazali, że obok stanu węzłów chłonnych również stopień ekspresji NDP-K był niezależnym czynnikiem prognostycznym. Potwierdzili więc zależność między niskim stopniem ekspresji NDP-K i skróceniem czasu przeżycia pacjentek [4]. Hirayama i wsp., badając

immunohistochemicznie barwiony materiał od 24 pacjentek z rakiem piersi, stwierdzili silną dodatnią korelację pomiędzy intensywnością reakcji immunochemicznej a 5 i 6-letnim przeżyciem chorych [48].

Podobne wyniki uzyskali również inni badacze, określając poziom ekspresji nm23-mRNA:

- Bevilacqua i wsp. w grupie 29 pacjentek,
- Hennessy i wsp. u 71 chorych.

Oparte na większej liczbie przypadków badanie Hennessy'ego wykazało, że wyższa ekspresja nm23-mRNA związana była z dłuższym OS i DFS i była skorelowana ze stanem węzłów chłonnych oraz stopniem złośliwości histologicznej. Natomiast, podobnie jak w mojej pracy, nie wykazano jej związku ze stanem hormonalnym i obecnością w guzie receptora estrogenowego. Autorzy stwierdzili również ujemną korelację pomiędzy wielkością guza a stopniem ekspresji nm23-mRNA, jednak, podobnie jak w moim badaniu ($p=0.06461$), zależność ta nie była istotna statystycznie ($p=0.434$) [5, 46].

Jak widać, wyniki badań nad znaczeniem rokowniczym nm23 nie są zbieżne.

Natomiast zaskakująca była moja obserwacja poczyniona na podstawie analizy Coxa, że wzrost ekspresji białka nm23 skraca czas wolny od objawów choroby. Wprawdzie wynik ten ($p=0,058$) był jedynie bliski założonemu poziomowi istotności statystycznej $p<0.05$, to jednak potwierdził się w jednowariantowej analizie korelacji Kruskala-Wallisa – wraz ze wzrostem ekspresji nm23 rosło ryzyko nawrotu odległego choroby nowotworowej ($p=0,03666$).

W jednym z większych przeprowadzonych badań (opartym na wieloletniej obserwacji 163 pacjentek bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych, które poza leczeniem chirurgicznym nie otrzymały żadnej terapii uzupełniającej – a zatem nie zmodyfikowano historii naturalnej choroby, w pełni eksponując jej potencjał do przerzutowania) wykazano ($p=0,008$), że chore z wysokim poziomem nm23 charakteryzowały się długim okresem przeżycia bezobjawowego (91% 15-letnich DSF) w porównaniu z pacjentkami o niskiej ekspresji nm23 (70% 15-letnich DSF) [43]. Autorzy sami podkreślają jednak, że grupa pacjentek była wyjątkowo jednorodna. Pacjentki wyodrębniono po selekcji chorych

leczonych w University of Chicago w przeciągu 60 lat (1927 - 1987 r.). Pacjentki ujęte w mojej pracy nie stanowiły tak homogennej grupy - podczas pięcioletniej obserwacji poddane były różnym metodom leczenia uzupełniającego: radioterapii, hormonoterapii, chemioterapii, a nawet kombinacji tych metod, co niewątpliwie jest czynnikiem zaburzającym analizę. W mojej grupie znajdowały się zarówno chore z przerzutami, jak i bez zmian w pachowych węzłach chłonnych. Ponadto Ruth Heimann i wsp. dysponowali trzykrotnie dłuższym - piętnastoletnim - średnim czasem obserwacji, co również stanowi o wyjątkowości ich badania. Inni badacze potwierdzają tę zależność [46]. Natomiast:

- Sawan i wsp. w grupie 197 pacjentek o różnym stanie pachowych węzłów chłonnych,
- Russel i wsp. u 40 chorych bez przerzutów do węzłów chłonnych
- Kapranos i wsp.

nie zaobserwowali wpływu ekspresji nm23 na DFS [58, 101, 107].

Istnieje bardzo duża rozbieżność w poglądach na temat rokowniczego znaczenia białka nm23. Na podstawie analizy piśmiennictwa widać, że uzyskany w mojej pracy wynik nie stoi w sprzeczności z powszechnie reprezentowanymi poglądami. Podobnie jednak jak wiele innych doniesień, moje wyniki nie potwierdzają roli białka nm23 w supresji przerzutowania. Może to sugerować, że ekspresja genu nm23 nie musi świadczyć o nieinwazyjnym charakterze guza.

Pozostaje jednak pytanie, dlaczego wyniki uzyskiwane w różnych badaniach są tak różne?

W literaturze podkreślany jest fakt, że w oznaczeniach immunohistochemicznych używane są przeciwciała różnych producentów oraz że ze względu na brak standaryzacji oznaczeń immunohistochemicznych, istnieją duże różnice w sposobie odczytywania natężenia ekspresji białka nm23 [13, 32, 116].

Różnice w rodzajach epitopów wykrywanych przez przeciwciała poszczególnych producentów widać bardzo wyraźnie po analizie prac, w których immunohistochemicznie oznaczano nm23 w zdrowej tkance gruczołu piersiowego:

- Barnes i wsp wykrywali silną ekspresję białka nm23 [4],

- Hirayama i wsp oraz Sawan i wsp. - niską ekspresję lub jej brak [48, 107],
- Goodall i wsp. oznaczyli znacznie niższe poziomy nm23 mRNA w zdrowej tkance gruczołu piersiowego i w zmianach łagodnych w porównaniu z materiałem pobranym z raka piersi [35].

W części badań ekspresja genu nm23 oznaczana była poprzez hybrydyzację mRNA – jest to kolejny czynnik, który może wpływać na odmienność uzyskiwanych wyników. Wprawdzie NDP-kinazy są produktami genu nm23, to jednak ze względu na dużą stabilność metaboliczną ich oznaczanie może prowadzić do innych wyników niż oznaczanie RNA. W pracy Sawan’a i wsp. porównywano rezultaty oznaczania nm23-mRNA i NDP-K i wykazano znaczącą korelacją pomiędzy wynikami obu testów, jednak zwrócono uwagę na liczne rozbieżności związane głównie z obecnością w materiale tkankowym NDP-kinaz przy braku ekspresji nm23-mRNA [107].

Należy również podkreślić, że w takich guzach jak: neuroblastoma, rak trzustki, rak szyjki macicy i rak płuca wysoki poziom nm23 jest związany z agresywnym przebiegiem choroby [14, 21, 26, 74]. Szczególnie intrygujące są wyniki badań nad rakiem żołądka, gdzie analiza 413 immunohistochemicznie barwionych preparatów wykazała istotną statystycznie korelację wysokiej ekspresji białka nm23-H1 z inwazją naczyń chłonnych i limfatycznych oraz z krótszym czasem przeżycia całkowitego. Nie wykazano natomiast związku z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych [83].

Zupełnie inne zjawisko obserwuje się w raku przełyku z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych, w raku wątrobowokomórkowym wątroby, raku jajnika, czerniaku skóry oraz raku jelita grubego, gdzie niska ekspresja nm23 wiąże się z silnym potencjałem przerzutowania [30, 77, 84, 124, 133].

Najsilniejszym czynnikiem prognostycznym, wpływającym zarówno na DSF, jak i OS, okazał się być stan pachowych węzłów chłonnych. Jest to obserwacja zgodna ze wszystkimi doniesieniami w literaturze [53, 91, 93, 107, 133]. Nie napotkałem żadnej pracy, która przyniosłaby inne wyniki.

Wielkość guza nowotworowego jest kolejnym klasycznym czynnikiem rokowniczym [12]. Większość ekspertów jest zgodna co do wpływu tego parametru na OS i DFS, szczególnie pożytecznego w raku piersi bez przerzutów do węzłów chłonnych pachowych [12, 99, 110].

W mojej pracy wielkość guza okazała się niezależnym czynnikiem ryzyka nawrotu choroby nowotworowej, nie miała jednak wpływu na przeżycie całkowite. Podobne rezultaty badań przytacza wielu autorów, np. Mc Guire stwierdza, że:

- u pacjentek z guzem mniejszym niż 1 cm średnicy ryzyko nawrotu wynosi od 1 do 10%,
- u chorych z guzem o wielkości powyżej 3 cm ryzyko nawrotu jest większe niż 50%,
- u pozostałych chorych (guz od 1 do 3 cm) nawrót choroby występuje w 30% [79].

W badaniach Grodeckiej-Gazdeckiej stwierdzono wprawdzie statystycznie istotną zależność pomiędzy wielkością guza nowotworowego a czasem przeżycia, jednak, podobnie jak w mojej pracy, nie potwierdzono tego wyniku w analizie wieloczynnikowej [40]. Również w innych doniesieniach nie stwierdzono prognostycznego znaczenia wielkości guza [44, 48].

Stopień zaawansowania klinicznego okazał się być czynnikiem ryzyka nawrotu choroby nowotworowej, nie mającym wpływu na całkowity czas przeżycia. Jest to zrozumiałe, bowiem jest on pochodną klinicznej oceny wielkości guza i stanu pachowych węzłów chłonnych. Wiadomo, że fizykalne badanie węzłów chłonnych jest nieprecyzyjne i często niezgodne z obrazem patologicznym węzłów chłonnych, dlatego też stopień zaawansowania klinicznego, ograniczony w moim badaniu tylko do IIa i IIb, nie jest czynnikiem prognostycznym i tylko w niewielkim stopniu może wpływać na DFS. W obserwowanej w badaniu grupie chorych kliniczne podejrzenie zajęcia węzłów chłonnych potwierdziło się w badaniu histopatologicznym zaledwie w 52%

przypadków, natomiast w 87% klinicznie niezmienione węzły pachowe okazały się wolne od przerzutów nowotworowych również w badaniu pooperacyjnym.

Ciekawym odkryciem było wykluczenie w mojej analizie stopnia złośliwości histologicznej spośród czynników prognostycznych - nie znalazł się on w żadnym z dwóch modeli statystycznych: dla OS i DFS. Powszechnie uważa się, że w przypadku raka przewodowego stopień złośliwości histologicznej jest ważnym czynnikiem wpływającym na rokowanie [15, 91, 107].

W innych pracach wykazano, że stopień złośliwości histologicznej jest czynnikiem prognostycznym, ale tylko w grupie chorych bez przerzutów do węzłów chłonnych [13]. Spostrzeżenie to potwierdza w swojej pracy S. Grodecka-Gazdecka.

Wynik mojego badania jest zbieżny z obserwacjami Heimanna i wsp.: w grupie 168 pacjentek bez przerzutów do węzłów chłonnych, leczonych jedynie chirurgicznie, a następnie w badaniu opartym na analizie 1590 chorych, nie wykazali oni prognostycznego znaczenia stopnia złośliwości histologicznej [43, 44].

Autorzy tych doniesień wykazali, że guzy o 2 i 3 stopniu złośliwości histologicznej, pomimo że charakteryzują się odmienną „*virulence*”, mają podobną skłonność do przerzutowania – „*metastagenicity*” [44, 45].

W mojej pracy badane były tylko guzy w 2 i 3 stopniu złośliwości histologicznej wg Blooma-Richardsona. Najprawdopodobniej między tymi dwoma stopniami różnica w oddziaływaniu na rokowanie jest zbyt mała, aby być istotną statystycznie. Zapewne istniałaby różnica pomiędzy 1 i 3 stopniem.

McGuire, który badał stopień złośliwości jądrowej, również obserwuje znaczne różnice w rokowaniu u pacjentek z guzami G1 w stosunku do tych, u których oznaczono G2 i G3 [79].

Należy także podkreślić, że patolodzy posługują się różnymi skalami i systemami służącymi do oceny stopnia złośliwości histologicznej, co może prowadzić do rozbieżności. Ponadto podkreśla się subiektywność oceny tego parametru nawet w rękach bardzo doświadczonych histopatologów. Zmianę w tej materii może przynieść upowszechniająca się komputerowa analiza obrazu.

Dość nieoczekiwanie oba modele Coxa, analizowane w mojej pracy, wyłoniły liczbę poronień jako niezależny czynnik prognostyczny, zarówno dla OS, jak i DFS. Wprawdzie w obu przypadkach zależność ta nie była istotna statystycznie ($p=0.17$ dla OS i $p=0.14$ dla DFS), jednak pozostała w modelach po ich redukcji metodą Akaike, która pozostawia zmienne o dużym wpływie. Autor niniejszej pracy znalazł w literaturze niewiele doniesień, które omawiałyby wpływ liczby poronień na rokowanie w raku piersi, co jest zaskakujące wobec olbrzymiej ilości publikacji omawiających etiologiczne znaczenie tego czynnika. Podobne wyniki opublikowano w pracy Yoshimoto i wsp. opartej na 10-letniej obserwacji 1190 chorych: wraz ze wzrostem liczby poronień rokowanie ulega poprawie i rzadziej występują przerzuty do narządów wewnętrznych [134]. Inne wyniki uzyskali Kroman i wsp. oraz Calle i wsp.: zarówno sztuczne, jak i naturalne poronienia, nie wpływały na rokowanie w raku piersi [11, 66].

Wyniki badań, zresztą nielicznych, są niejednoznaczne. Nie można też ocenić, na ile wiarygodny jest wywiad dotyczący poronień, w szczególności sztucznych: pacjentki często zafałszowują te dane ze względu na uwarunkowania społeczne i prawne. Liczba pacjentek, jaką dysponowałem w analizie, nie uprawnia mnie do postawienia tezy, że większa liczba poronień poprawia rokowanie w raku piersi i wydłuża okres bezobjawowego przeżycia. Niemniej jednak wynik badania jest intrygujący.

Większa liczba porodów okazała się być czynnikiem sprzyjającym nawrotowi choroby nowotworowej. Dane dostępne na ten temat w literaturze dotyczą zwykle wpływu tego czynnika na przeżycie całkowite, lecz wydają się potwierdzać także wynik mojego badania. Olson i wsp. oraz Guinee i wsp. zaobserwowali znacząco gorsze rokowanie u kobiet, u których raka piersi stwierdzono w czasie ciąży lub w ciągu 2 lat po porodzie, ryzyko to zmniejsza się o około 15 % rocznie. Wykazano umiarkowaną korelację pomiędzy ilością porodów a złym rokowaniem: kobiety, które rodziły 3 lub więcej razy, mają 1,8 razy większe relatywne ryzyko zgonu z powodu raka piersi w stosunku do nieródek, co wydaje się być zaskakującym rezultatem wobec ochronnej roli porodów w etiologii raka piersi [41, 88].

Inne wyniki opublikowali Kroman i wsp. oraz Schouten i wsp.: nie wykazali oni prognostycznego znaczenia ilości donoszonych ciąż, stwierdzili natomiast gorsze rokowanie wśród kobiet, które rodziły po raz pierwszy poniżej 20 roku życia w stosunku do tych, które urodziły pierwsze dziecko w wieku 20 – 29 lat [68, 108].

Z badań Toikkanen i wsp. wynika, że przebyty w przeszłości przez pacjentkę rak piersi zwiększa ryzyko zgonu przy zachorowaniu na drugiego, pierwotnego raka sutka [122]. Slattery i wsp. wykazali, że pacjentki, których matki chorowały na raka piersi, obarczone były gorszym rokowaniem, podobnie jak chore poniżej 50 roku życia, u których rak piersi występował w rodzinie [112].

Wyniki moich badań jedynie częściowo potwierdziły powyższe obserwacje. Przebyta przez pacjentkę w przeszłości złośliwa choroba nowotworowa (w większości przypadków był to rak piersi) skracala okres wolny od objawów choroby, nie wpływała natomiast na przeżycie całkowite. Nie wykazałem wpływu występowania raka piersi wśród krewnych pierwszego stopnia na OS ani DFS. Schouten i wsp. również nie stwierdzili wpływu wywiadu rodzinnego na rokowanie [108].

Prognostyczne znaczenie wieku chorej jest szeroko dyskutowane w literaturze i nadal jest przedmiotem sporów badaczy. Wyniki większości badań sugerują, że wśród kobiet przed menopauzą chore poniżej 35 roku życia mają gorsze rokowanie. Częściej stwierdza się u nich inne niekorzystne czynniki rokownicze, jednak młody wiek pozostaje niezależnym czynnikiem prognostycznym [1, 51, 87]. Takie stanowisko jest obecnie akceptowane przez większość ekspertów. Szereg badań wskazuje również na lepsze rokowanie wśród kobiet w wieku 35-49 i gorsze wśród starszych osób, szczególnie po 75 roku życia [1, 51, 105, 122]. W mojej pracy nie wykazałem wpływu wieku na OS i DFS. Podobne obserwacje poczynili Heimann i wsp. w grupie pacjentek bez przerzutów do węzłów chłonnych, które były leczone jedynie chirurgicznie [43]. (Muszę jednak zaznaczyć, że tylko jedna pacjentka w badanej przeze mnie grupie miała mniej niż 35 lat. Chora ta w momencie rozpoznania miała 29 lat, guz

wielkości 4 cm, II stopień wg Blooma-Richardsona, przerzuty w węzłach pachowych, ER=0, nm23=4. Nawrót choroby nastąpił w 121 tygodniu i zmarła w 230 tygodniu obserwacji.) Ponadto młodsze chore z obecnymi czynnikami ryzyka poddane były intensywnemu leczeniu uzupełniającemu, co - jak wynika z badań Andersona i wsp. oraz Kromana i wsp. - prowadzi do uzyskania podobnego rokowania jak u kobiet starszych [3, 67].

Stwierdziłem natomiast wpływ stanu hormonalnego pacjentek na czas przeżycia wolny od objawów choroby oraz na całkowite przeżycie. Pacjentki przed menopauzą charakteryzowały się lepszym rokowaniem. Najprawdopodobniej wynika to z mniej intensywnego leczenia u kobiet po menopauzie – istniała tendencja do częstszego stosowania w tej grupie hormonoterapii niż chemioterapii. (Ze względu na niedostępność oznaczeń receptorów steroidowych typowym postępowaniem było leczenie tamoksyfenem kobiet po menopauzie - spowodowanej również wcześniejszą ovariectomią z innych niż rak piersi przyczyn). Natomiast chore miesiączkujące standardowo otrzymywały uzupełniające leczenie chemiczne. Wyniki badania Retsky'ego i wsp. wydają się potwierdzać tę obserwację: wprowadźcie autorzy w grupie 1173 chorych (N+ i N-) leczonych wyłącznie chirurgicznie (badanie retrospektywne oparte na 16-20 letniej obserwacji kobiet leczonych przed „erą” chemioterapii) nie stwierdzili różnic w przeżyciu pomiędzy pacjentkami przed i po menopauzie, to jednak, wobec udowodnionej skuteczności chemioterapii, jej ewentualne częstsze stosowanie w pierwszej grupie mogłoby przynieść wyniki podobne do obserwowanych przeze mnie [98].

Przeprowadzona w mojej pracy analiza pozwoliła na wyodrębnienie dwóch grup chorych o krańcowo odmiennej prognozie:

1. Siedem pacjentek o bardzo dobrym rokowaniu:

- bez przerzutów do węzłów chłonnych;
- stopień ekspresji ER w skali IRS większy lub równy 4;
- nadal miesiączkują.

W grupie tej nie zmarła ani jedna osoba w 5-letnim okresie obserwacji.

2. Osiemnaście chorych o bardzo złym rokowaniu:

- z przerzutami do węzłów chłonnych;
- stopień ekspresji ER w skali IRS mniejszy lub równy 3;
- niemiesiączkujące.

W grupie tej zmarło 7 osób (38,88% zgonów w trakcie pięcioletniej obserwacji).

Następnym etapem badania była analiza związków pomiędzy stopniem ekspresji białka nm23 i receptora estrogenowego a innymi wskaźnikami kliniczno-patologicznymi. Posłużyłem się w tym celu klasycznymi metodami statystycznymi, jakimi są: test Kruskala-Wallisa oraz współczynniki korelacji Kendalla i Spearmana dla rang.

Testy wykazały brak znamiennych statystycznie korelacji pomiędzy stopniem ekspresji receptora estrogenowego w guzach piersi a wszystkimi badanymi czynnikami kliniczno-patologicznymi.

Jedynie testowanie związków ER ze stanem węzłów chłonnych wykazało umiarkowaną korelację przy wartości $p=0.06681$. W większości cytowanych wyżej badań nie wykazano istotnej zależności pomiędzy ER a przerzutami do pachowych węzłów chłonnych [37, 71, 80].

Natomiast w badaniach Caldarola i wsp. oraz Skinnera i wsp., podobnie jak w moim, stwierdzono wbrew oczekiwaniom częstsze występowanie przerzutów do węzłów chłonnych u pacjentek z guzami ER+, jednak również i tutaj zależności nie były znamienne statystycznie [9, 111].

Innymi ujawnionymi w mojej pracy korelacjami były: częstsze występowanie guzów ER+ u starszych pacjentek ($p=0.1338$) oraz u pacjentek po menopauzie ($p=0.1574$). Ale w obu przypadkach zależności te nie były istotne statystycznie.

W większości badań znalazłem potwierdzenie dla tej obserwacji. Wielu autorów wykazało dla tej zależności znamienność statystyczną [10, 36, 37, 40, 94, 95, 130]. Z kolei inne doniesienia jej nie potwierdzają [111].

Często rozpatrywanym w piśmiennictwie związkiem jest zależność pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej a obecnością receptorów estrogenowych w guzie. Wyniki różnych badań są niejednoznaczne. O istnieniu takiej korelacji donosi Grodecka-Gazdecka, Caldarola i wsp., Williams i wsp., Pertschuk i wsp. [10, 40, 94, 130].

Inne wyniki - brak związku ze stopniem złośliwości - zaobserwowali Gorlich i wsp., Skinner i wsp. [37, 111]. Rozbieżności te mogą wynikać ze wspomnianej już uprzednio subiektywności oceny, wielości skal i systemów, na których opierają się patolodzy przy określaniu tego parametru. W moim badaniu guzy o II stopniu złośliwości histologicznej wg Blooma-Richardsona charakteryzowały się wyższymi poziomami ER w stosunku do B III, jednak różnica ta nie była znamienna statystycznie.

Moje obserwacje na temat znaczenia pozostałych czynników kliniczno-patologicznych znalazły potwierdzenie w literaturze przedmiotu. Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją ER a:

- wielkością guza (Caldarola i wsp.) [10],
- stopniem zaawansowania klinicznego (Gorlich i wsp.) [37],
- wywiadem rodzinnym dotyczącym raka piersi (Skinner i wsp.) [111],
- ilością porodów, poronień, wzrostem, wielkością guza (Kuno i wsp.) [71].

Zależności te znajdują się jednak poza głównym nurtem dociekań, reprezentowanym przez większość pozycji piśmiennictwa.

Testy, również w przypadku stopnia ekspresji białka nm23-H1, nie wykazały korelacji dla większości analizowanych zmiennych (w tym dla receptora estrogenowego). Jedyny istotny statystycznie związek zaobserwowano dla ryzyka nawrotu odległego choroby nowotworowej: ryzyko wznowy zwiększało się wraz ze wzrostem poziomu ekspresji białka nm23. Obserwacja ta potwierdziła wyniki analizy wieloczynnikowej o niekorzystnym wpływie wysokiego poziomu ekspresji białka nm23 na DFS.

Stwierdziłem również nieistotną statystycznie zależność pomiędzy nm23 a wielkością guza nowotworowego: duże guzy charakteryzowały się w moim badaniu niższym poziomem białka nm23.

W badaniach Vazquez-Ramirez i wsp., przeprowadzonych na grupie 72 pacjentek z wyczuwalnym lub niebadalnym fizykalnie rakiem piersi, nie poddanych leczeniu hormonalnemu ani chemioterapii, nie stwierdzono korelacji pomiędzy nasileniem ekspresji białka nm23 a klasycznymi czynnikami prognostycznymi: wielkością guza, stanem węzłów chłonnych, stopniem złośliwości histologicznej i stopniem ekspresji receptora estrogenowego. Wyniki te są zgodne z moimi obserwacjami. Szczególne znaczenie interpretacyjne cytowanej pracy wynika z faktu stosowania przez jej autorów przeciwciał monoklonalnych przeciwko białku nm23-H1 tego samego producenta (Novocastra, clone 37.6) [128]. Brak korelacji ze stanem węzłów chłonnych przeczy tezie o supresyjnym wpływie NDP-K na powstawanie przerzutów.

Podobne obserwacje opisali Hirayama i wsp., badając 24 pacjentki z rakiem piersi, oraz Sporek w swojej rozprawie doktorskiej, w której analizował 30 przypadków raka piersi: brak korelacji z wielkością guza, stanem węzłów chłonnych i typem histologicznym [48, 114].

Również Bevilacqua i wsp., którzy oznaczali ekspresję nm23 mRNA w 27 preparatach raka przewodowego piersi nie zaobserwowali związków z wielkością guza, stopniem złośliwości histologicznej ani ekspresją receptora estrogenowego [5].

Zaskakujące dane przytoczyli Goodall i wsp.: w badanej grupie 132 chorych z rakiem piersi stwierdzili oni tendencję do niższych poziomów ekspresji nm23 w grupie pacjentek bez przerzutów do węzłów chłonnych ($p < 0.03$) [35].

Seria innych badań przyniosła rezultaty zbieżne z uzyskanymi przeze mnie:

- Sastre-Garau i wsp., w badaniu 98 inwazyjnych raków piersi o różnym utkaniu, zaobserwowali brak korelacji nm23 z ER, PR i wielkością guza [106].
- Sawan i wsp. (197 pacjentek) oraz Dueñas-González i wsp. (badanie na 33 chorych) wprawdzie stwierdzili korelację ekspresji nm23 ze stanem węzłów chłonnych, ale - podobnie jak w mojej pracy - nie wykazali związku ze stanem hormonalnym, stopniem złośliwości histologicznej guza, poziomem ekspresji receptora estrogenowego i ilością porodów [24, 107].

- Kapranos i wsp. nie zaobserwowali związku białka nm23 z poziomem ekspresji receptora estrogenowego [58].

Inne wyniki uzyskali Tokunaga i wsp. (duże badanie na grupie 130 pacjentek) oraz Royds i wsp. (67 pacjentek z rakiem inwazyjnym i 26 z rakiem przewodowym in situ), którzy zaobserwowali korelację pomiędzy natężeniem ekspresji immunohistochemicznie oznaczanego białka nm23-H1 a stanem węzłów chłonnych, stopniem złośliwości histologicznej oraz skłonnością do przerzutowania [100, 123]. Wykazano również brak ekspresji białka nm23 w rakach przewodowych in situ typu comedo, które częściej niż non-comedo przekształcają się w raka inwazyjnego [100].

Jedynym wskaźnikiem kliniczno-patologicznym, który w mojej pracy wykazał korelację z ekspresją białka nm23 była wielkość guza. Stwierdziłem, że małe guzy częściej wykazywały wyższe natężenie ekspresji ww. proteiny. Związek ten był jedynie bliski istotności statystycznej. Większość przytoczonych powyżej prac nie stwierdza takiej zależności. Obserwacje zbliżone do moich poczynili jednak Henessy i wsp., Heimann i wsp. oraz Toulas i wsp. [43, 46, 125].

Nie znalazłem w literaturze przedmiotu danych porównujących ekspresję nm23 z takimi czynnikami jak stan odżywienia, ilość porodów i poronień, wywiad nowotworowy chorej i jej rodziny.

Na podstawie analizy piśmiennictwa okazuje się, że podobnie jak w przypadku oceny prognostycznego znaczenia białka nm23, dane dotyczące korelacji z klasycznymi wskaźnikami kliniczno-patologicznymi są rozbieżne. W szczególności brak korelacji poziomu białka nm23 ze stanem węzłów chłonnych pachowych wydaje się potwierdzać moje wcześniejsze obserwacje dotyczące braku prognostycznego znaczenia tego białka.

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonej analizy zebranych danych sformułowano następujące wnioski dotyczące obserwowanej grupy chorych:

1. Czynniki prognostycznymi wpływającymi niekorzystnie na całkowity czas przeżycia są: obecność przerzutów w pachowych węzłach chłonnych, niski stopień ekspresji receptora estrogenowego oraz brak miesiączkowania. Można przypuszczać, że brak lub mała liczba poronień w wywiadzie także niekorzystnie wpływają na OS.
2. Czynniki prognostycznymi wpływającymi niekorzystnie na czas przeżycia wolny od objawów choroby są: obecność przerzutów w pachowych węzłach chłonnych, niski stopień ekspresji receptora estrogenowego, brak miesiączkowania, duża wielkość guza nowotworowego, wyższy stopień zaawansowania klinicznego, duża liczba porodów oraz wcześniejsza choroba nowotworowa w wywiadzie pacjentki. Można przypuszczać, że brak lub mała liczba poronień w wywiadzie oraz wysoki poziom ekspresji białka nm23-H1 także wpływają niekorzystnie na DFS.
3. Czynniki szczególnie dobrego rokowania u chorych na raka piersi wydają się być: brak przerzutów do pachowych węzłów chłonnych, utrzymany cykl miesięczny oraz stopień ekspresji receptora estrogenowego w skali IRS większy lub równy 4.

4. Czynniki szczególnie złego rokowania u chorych na raka piersi wydają się być: przerzuty do pachowych węzłów chłonnych, stopień ekspresji receptora estrogenowego w skali IRS mniejszy lub równy 3 oraz brak miesiączkowania.
5. Wraz ze wzrostem nasilenia ekspresji białka nm23 wzrasta ryzyko nawrotu odległego choroby nowotworowej.

STRESZCZENIE

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym wśród kobiet w Polsce i większości rozwiniętych krajów świata. Jest on najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych chorobą nowotworową u kobiet w Polsce. Około 50 % pacjentów po leczeniu żyje bez wznowy i objawów choroby. Do nawrotów choroby dochodzi najczęściej w 2 – 3 roku obserwacji i w 1/3 przypadków są to wznowy miejscowe, natomiast w 2/3 przypadków – rozsiew krwio pochodny. Ponieważ znane obecnie czynniki prognostyczne i predykcyjne jedynie w przybliżeniu pozwalają ocenić ryzyko wznowy lub rozsiewu, istnieje duże zainteresowanie identyfikacją nowych wskaźników, które umożliwiłyby indywidualny dobór leczenia uzupełniającego, a z drugiej strony - w części bardzo dobrze rokujących przypadków - pozwoliłyby na uniknięcie niepotrzebnej, toksycznej terapii.

Gen nm23 (**non**metastatic) zlokalizowany w chromosomie 17q21 koduje białka z grupy nukleozydowych kinaz dwufosforanowych (NDP-K). Obserwowano zależność pomiędzy zmniejszoną ekspresją białek z tej grupy, a większą częstością występowania przerzutów, niskim zróżnicowaniem komórek nowotworowych i niską ekspresją receptora estrogenowego w komórkach raka piersi. Szeroko dyskutowane są w literaturze związki pomiędzy ekspresją NDP-K a stanem węzłów chłonnych pachowych, rokowaniem i czasem wolnym od choroby nowotworowej. Wyniki badań oscylują od bardzo zachęcających, do

podważających znaczenie tego genu jako markera inwazyjnego fenotypu guza nowotworowego.

Receptor estrogenowy (ER) jest powszechnie uznanym niezależnym wskaźnikiem prognostycznym i predykcyjnym, chociaż istnieją prace wskazujące na brak prognostycznej wartości zawartości ER w komórkach raka. Większość badań wskazuje na obecność silnego związku pomiędzy ekspresją ER a czasem całkowitego przeżycia, czasem do wystąpienia przerzutów odległych i wrażliwością raka na hormonoterapię.

Zasadniczym celem pracy było zbadanie związków pomiędzy obecnością białka nm23-H1 i receptorów estrogenowych w komórkach raka przewodowego piersi a czasem przeżycia pacjentek oraz okresem wolnym od objawów choroby. Z tym wiąże się określenie przydatności omawianych markerów do oceny prognozy i wyłonienia spośród jednolitej grupy pacjentek w II stopniu klinicznego zaawansowania raka piersi podgrup chorych o dobrym i złym rokowaniu, co mogłoby ułatwić decyzje dotyczące leczenia uzupełniającego. Podobnej analizie poddano klasyczne wskaźniki kliniczno-patologiczne.

Kolejnym celem niniejszej pracy była ocena zależności pomiędzy dwoma badanymi markerami oraz parametrami kliniczno-patologicznymi powszechnie uważanymi za czynniki prognostyczne jak i tymi bez udowodnionego znaczenia rokowniczego

Badaniem objęto grupę 101 pacjentek leczonych w 1993 i 1994 r. w Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu z powodu raka przewodowego piersi o stopniu złośliwości histologicznej 2 i 3 wg Blooma-Richardsona w II stopniu zaawansowania klinicznego. Na skrawkach pochodzących z archiwalnych bloczków parafinowych przeprowadzone zostały reakcje immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał monoklonalnych przeciwko białku nm23-H1 i receptorowi estrogenowemu. Dane kliniczne pacjentek zostały skompletowane na podstawie historii chorób będących w zasobach rejestracji i archiwum DCO. Dane dotyczące zgonów zostały ustalone przy współpracy Dolnośląskiego Rejestru Nowotworów i regionalnych Urzędów Stanu Cywilnego.

Autor w analizie statystycznej danych dotyczących wpływu poszczególnych czynników na przeżycie i czas trwania remisji posłużył się analizą Coxa wykorzystującą metodę Akaike do wyboru zmiennych w modelu statystycznym. Stworzono w tym celu dwa oddzielne modele:

- jeden, do analizy całkowitego czasu przeżycia (OS)
- drugi, dla oceny czasu przeżycia wolnego od objawów choroby (DFS).

Następnym etapem badania była analiza związków pomiędzy stopniem ekspresji białka nm23 i receptora estrogenowego a innymi wskaźnikami kliniczno-patologicznymi. Posłużono się w tym celu nieparametrycznymi testami statystycznymi jakimi są: test Kruskala-Wallisa oraz współczynniki korelacji Kendalla i Spearmana dla rang.

Na podstawie przeprowadzonej analizy wielowariantowej zebranych danych sformułowano następujące wnioski dotyczące obserwowanej grupy chorych:

1. Receptor estrogenowy był czynnikiem prognostycznym wpływającym na OS i DFS. Wraz ze wzrostem nasilenia ekspresji ER wg IRS rokowanie ulega poprawie. Najsilniejszym czynnikiem prognostycznym, wpływającym niekorzystnie na OS i DFS, była obecność przerzutów w węzłach chłonnych pachowych. Kobiety po menopauzie były zdecydowanie bardziej narażone na zgon i wznowę niż kobiety miesiączkujące.
2. Większa liczba poronień, pomimo że nie jest czynnikiem istotnym statystycznie ($p=0.17$ dla OS i $p=0.14$ dla DFS), pozostała w obu modelach Coxa, co sugeruje, że pacjentki, które roniły, miały lepszą prognozę przeżycia i dłuższy okres bezobjawowy. Nie można jednak przy tej liczbie obserwacji postawić tezy, że duża liczba poronień zmniejsza ryzyko zgonu i nawrotu choroby. Problem ten powinien być przedmiotem dalszych badań.
3. Wraz ze wzrostem wielkości guza, stopnia zaawansowania i ilości porodów zwiększało się ryzyko nawrotu choroby. Pacjentki, które chorowały w przeszłości na nowotwory złośliwe, jak również chore niemiesiączkujące, charakteryzowały się krótszym DFS. Natomiast wpływ nm23 na DSF ($p=0.0580$) był bliski istotności, a wzrost ekspresji tego znacznika skracał czas remisji.

4. Białko nm23-H1 nie było czynnikiem prognostycznym wpływającym na całkowity czas przeżycia. Nie wykazano również prognostycznego znaczenia następujących zmiennych: wielkość guza w centymetrach, wiek w latach, stopień zaawansowania klinicznego, stopień złośliwości histologicznej wg Blooma-Richardsona, czas trwania miesiączkowania w latach, ilość porodów, stan odżywienia wg BMI, dotychczasowy wywiad nowotworowy pacjentek, rak piersi w wywiadzie u krewnych I stopnia i nowotwór inny niż rak sutka w wywiadzie rodzinnym.
5. Spośród analizowanych zmiennych wiek, stopień złośliwości, czas trwania okresu miesiączkowania oraz stan odżywienia nie miały znamiennej statystycznie wpływu na czas remisji w obserwowanej grupie chorych na raka piersi.

Na podstawie przeprowadzonych analiz jednoczynnikowych dla poszczególnych parametrów kliniczno-patologicznych możemy sformułować następujące wnioski dotyczące obserwowanej grupy chorych:

1. Nie wykazano zależności pomiędzy nasileniem ekspresji ER i nm23-H1.
2. Nie stwierdzono znamiennej statystycznie zależności pomiędzy nasileniem ekspresji receptora estrogenowego wg IRS a testowanymi szesnastoma parametrami klinicznymi. Najsilniejszą korelację wykazano pomiędzy ER a wiekiem chorych – u osób starszych ekspresja ER była silnej wyrażona. Związek ten nie był w badanej grupie pacjentek istotny statystycznie.
3. Wraz ze wzrostem nasilenia ekspresji białka nm23 zwiększało się ryzyko nawrotu odległego choroby nowotworowej. Obserwacja ta potwierdziła wyniki analizy wieloczynnikowej o niekorzystnym wpływie wysokiego poziomu ekspresji białka nm23 na DFS. Zaobserwowano nieznamienną statystycznie tendencję do występowania niskich poziomów nm23 w dużych guzach. W większości przypadków, dla 14 testowanych zmiennych, nie wykazano ich związku z ekspresją białka nm23 mierzoną wg IRS. W szczególności brak korelacji ze stanem węzłów chłonnych przeczy tezie o supresyjnym wpływie NDP-K na powstawanie przerzutów.

Należy jednak podkreślić, że ze względu na stosunkowo niewielką grupę uwzględnionych w analizie pacjentek (101 osób), z punktu widzenia statystycznego, badanie powinno być traktowane jako pilotażowe.

Udało się również wyodrębnić dwie grupy chorych o krańcowo odmienniej prognozie.

1. Siedem pacjentek o bardzo dobrym rokowaniu:

- bez przerzutów do węzłów chłonnych
- stopień ekspresji ER w skali IRS większy lub równy 4
- nadal miesiącują

W grupie tej nie zmarła ani jedna osoba w 5-letnim okresie obserwacji.

2. Osiemnaście chorych o bardzo złym rokowaniu:

- z przerzutami do węzłów chłonnych
- stopień ekspresji ER w skali IRS mniejszy lub równy 3
- niemiesiącujące

W grupie tej zmarło 7 osób (38,88% zgonów w trakcie pięcioletniej obserwacji).

PIŚMIENNICTWO

1. **Adami HO, Malaker B, Holmberg L i wsp.:** The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1986, 315 (9), 559-563.
2. **American Joint Committee on Cancer:** AJCC Cancer Staging Manual: Breast. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 5th ed., 1997, 171-180.
3. **Anderson BO, Senie RT, Vetto JT i wsp.:** Improved survival in young women with breast cancer. *Ann Surg Oncol* 1995, 2(5), 407-415.
4. **Barnes R, Masood S, Barker E i wsp.:** Low nm23 protein expression in infiltrating ductal breast carcinomas correlates with reduced Patient survival. *Am J Pathol* 1991, 139, 245-250.
5. **Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA i wsp.:** Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinoma with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 1989, 49, 5185-5190.
6. **Bhatia S, Robison LL, Oberlin O i wsp.:** Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1996, 334(12), 745-751.
7. **Blamey RW, Bishop HM, Blake JR i wsp.:** Relationship between primary breast tumor receptor status and patient survival. *Cancer* 1980, 46 (12 Suppl.), 2765-2769.
8. **Brinton LA, Schairer C, Hoover RN i wsp.:** Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Investigation* 1988, 6(3), 245-254.
9. **Caldarola L, Calderini P, Volterrani P i wsp.:** The correlation between estrogen receptor status, axillary node metastases and disease free interval after surgery primary breast cancer. *Ital J Surg Sci* 1983, 13 (3), 179-185.
10. **Caldarola L, Volterrani P, Lai M i wsp.:** The correlation between estrogen and progesterone receptors and some clinical and pathological features in human breast cancer. *Ital J Surg Sci* 1985, 15 (4), 329-333.
11. **Calle EE, Mervis CA, Wingo PA i wsp.:** Spontaneous abortion and risk of fatal breast cancer in a prospective cohort of United States women. *Cancer Causes Control* 1995, 6 (5), 460-480.

12. **Carter CL, Allen C, Henson DE:** Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989, 63(1), 181-187.
13. **Charpin C, Garcia S, Bonnier P i wsp.:** Prognostic significance of nm23/NDPK expression in breast carcinoma, assessed on 10-year follow-up by automated and quantitative immunocytochemical assays. *J Pathol* 1998, 184, 401-407.
14. **Chen H-Y, Hsu C-T, Lin W-C i wsp.:** Prognostic value of nm23 expression i stage IB1 cervical carcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2001, 31, 327-332.
15. **Clark GM:** Prognosis and breast cancer. Recognition of lethal and favorable prognostic types. *Am J Surg Pathol* 1991, 15, 334-349.
16. **Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE:** Risk factors for breast cancer according to family history of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996, 88(6), 365-371.
17. **Colditz GA:** Epidemiology of breast cancer. Findings from the nurses' Health study. *Cancer* 1993, 71 (4 Suppl), 1480-1489.
18. **Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer:** Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 1997, 350(9084), 1047-1059.
19. **Costantino JP, Kuller LH, Ives DG i wsp.:** Coronary heart disease mortality and adjuvant tamoxifen therapy. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89(11), 776-782.
20. **Cummings SR, Eckert S, Krueger K i wsp.:** The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. *JAMA* 1999, 281(23), 2189-2197.
21. **De La Rosa A, Williams RL, Steeg PS:** nm23/nucleoside diphosphate kinases: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. *Bioessays* 1995, 17, 53-62.
22. **Dickson RB, Lippman ME:** Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev* 1995, 16 (5), 559-589.
23. **Domagała W:** Klasyczne i nowe czynniki prognostyczne i predykcyjne w raku sutka u kobiet. *Nowotwory* 1996, 46, 669-690.
24. **Dueñas-González A, Abad-Hernández MM, García-Mata J i wsp.:** Analysis of nm23-H1 expression in breast cancer. Correlations with p53 expression and clinicopathologic findings. *Cancer Letters* 1996, 101, 137-142.
25. **Easton DF, Bishop DT, Ford D i wsp.:** Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *American Journal of Human Genetics* 52(4), 678-701, 1993.
26. **Engel M, Theisinger B, Seib T i wsp.:** High levels of nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA in human squamous-cell lung carcinoma are associated with poor differentiation and advanced tumor stages. *Int J Cancer* 1993, 55(3), 375-379.

27. **Fisher B, Costantino JP, Redmond CK i wsp.:** Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86(7), 527-537.
28. **Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL i wsp.:** Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst* 1998, 90(18), 1371-1388.
29. **Fletcher SW, Black W, Harris R i wsp.:** Report of the International Workshop on Screening for Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85 (20), 1644-1656.
30. **Florenes VA, Aamdal S, Myklebos O i wsp.:** Levels of nm23 messenger RNA in metastatic malignant melanomas: inverse correlation to disease progression. *Cancer Res* 1992, 52, 6088-6091.
31. **Fox MS:** On the diagnosis and treatment of breast cancer. *JAMA* 1979, 241 (5), 489-494.
32. **Freije JMP, MacDonald M, Steeg PS:** Differential gene expression in tumor metastasis: nm23. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996, 213, 215-232.
33. **Gasparini G, Pozza F, Harris AL:** Evaluating the potential usefulness of new prognostic and predictive indicators in node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85, (15), 1206-1219.
34. **Glasscock RF, Hoekstra WG:** Selective accumulation of tritium-labeled hexoestrol by the reproductive organs of immature female goats and sheeps. *Biochem J* 1959, 72, 673-682.
35. **Goodall RJ, Dawkins HJ, Robbins PD i wsp.:** Evaluation of the expression of nm23-H1 mRNA in primary breast cancer, benign breast disease, axillary lymph nodes and normal breast tissue. *Pathology* 1994, 26 (4), 423-428.
36. **Gorczyca W, Olszewski W, Woyke S i wsp.:** Immunocytochemiczna ocena receptora estrogenowego w preparatach histologicznych pierwotnych raków sutka. *Patol Pol* 1990, 41 (1-2), 58-66.
37. **Gorlich M, Jandrig B:** Steroid hormone receptors related to parameters characterizing the biology of human breast cancer. *Tumori* 1997, 83(6), 930-937.
38. **Gotlieb L, Kaufman L, Leclercq G i wsp.:** Comparison of immunohistochemical and biochemical measurement of steroid receptors in breast cancer: are both still necessary? *Breast* 2001, 10, 470-475.
39. **Greenlee RT, Murray T, Bolden S i wsp.:** Cancer statistics, 2000. *Ca-A Cancer J Clin* 2000, 50(1), 7-33.
40. **Grodecka-Gazdecka S:** Wartość rokownicza wybranych czynników patoklinicznych i markerów immunohistochemicznych w raku gruczołu piersiowego bez przerzutów do węzłów chłonnych. *Nowotwory* 1998, 48 231-267.
41. **Guinee VF, Olsson H, Moller T i wsp.:** Effect of pregnancy on prognosis for young women with breast cancer. *Lancet* 1994, 343 (8913), 1587-1589.
42. **Hartmann LC, Schaid DJ, Woods J i wsp.:** Efficacy of bilateral

prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *N Engl J Med* 1999, 340(2), 77-84.

43. **Heimann R, Ferguson DJ, Hellman S:** The relationship between nm23, angiogenesis, and the metastatic proclivity of node-negative breast cancer. *Cancer Res* 1998, 58, 2766-2771.
44. **Heimann R, Hellman S:** Individual characterization of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *Eur J Cancer* 2000, 36, 1631-1639.
45. **Heimann R, Lan F, McBride R, Hellman S:** Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res* 2000, 60, 298-304.
46. **Hennessy C, Henry JA, May FEB i wsp.:** Expression of the antimetastatic gene nm23 in human breast cancer: an association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst* 1991, 83, 281-285.
47. **Hindle WH, Davis L, Wright D:** Clinical value of mammography for symptomatic women 35 years of age and younger. *Am J Obstet Gynecol* 1999, 180, 1484-1490.
48. **Hirayama R, Sawai S, Takagi Y i wsp.:** Positive relationship between expression of anti-metastatic factor (nm23 gene product or nucleoside diphosphate kinase) and good prognosis in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991, 83, 1249-1250.
49. **Hirayama T, Wynder EL:** A study of the epidemiology of cancer of the breast, II: the influence of hysterectomy. *Cancer* 1962, 15(1), 28-38.
50. **Hollander M, Wolfe DA:** Nonparametric statistical inference. John Wiley & Sons, New York, 1973.
51. **Host H, Lund E:** Age as a prognostic factor in breast cancer. *Cancer* 1986, 57 (11), 2217-2221.
52. **Jassem J (red.):** Rak sutka. Warszawa, Springer PWN, 1998, 168-181.
53. **Jeziorski A, Jakubik J:** Liczba zajętych węzłów chłonnych pachy jako czynnik prognostyczny w raku sutka. *Nowotwory* 1995, 45, 652-662.
54. **Joensuu H, Toikkanen S:** Cured of breast cancer? *J Clin Oncol* 1995, 13(1), 62-69.
55. **John EM, Kelsey JL:** Radiation and other environmental exposures and breast cancer. *Epidemiologic Reviews* 15(1), 157-162, 1993.
56. **Kalbfleisch J, Prentice RL:** The Statistical Analysis of Failure Time Data. John Wiley & Sons, New York, 1980.
57. **Kampert JB, Whittemore AS, Paffenbarger RS:** Combined effect of childbearing, menstrual events, and body size on age-specific breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 1988, 128(5), 962-979.
58. **Kapranos N, Karaioissifidi H, Kouri E i wsp.:** Nm23 expression in breast ductal carcinomas: a ten year follow-up study in a uniform group of node-negative breast cancer patients. *Anticancer Res* 1996, 16 (6C), 3987-3990.
59. **Kliwer EV, Smith KR:** Breast cancer mortality among immigrants in

- Australia and Canada. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87(15), 1154-1161.
60. **Knight WA III, 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.
 61. **Koenders PG, Beex LV, Kloppenborg PW i wsp.:** Human breast cancer: survival from first metastasis. The Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat* 1992, 21(3), 173-180.
 62. **Koenders PG, Beex LV, Langens R i wsp.:** Steroid hormone receptor activity of primary human breast cancer and pattern of first metastasis. The Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat* 1991, 18 (1), 27-32.
 63. **Korenman SG, Dukes BA:** Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast carcinoma. *J Clin Endocr* 1970, 30, 639-645.
 64. **Koscielny S, Tubiana M, Le MG i wsp.:** Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 1984, 49 (6), 709-715.
 65. **Koscielny S, Le MG, Tubiana M:** The natural history of human breast cancer. The relationship between involvement of axillary lymph nodes and the initiation of distant metastases. *Br J Cancer* 1989, 59 (5), 775-782.
 66. **Kroman N, Jensen MB, Melbye M i wsp.:** Should women be advised against pregnancy after breast-cancer treatment. *Lancet* 1997, 350 (9074), 319-322.
 67. **Kroman N, Jensen MB, Wohlfahrt J i wsp.:** Factors influencing the effect of age in breast cancer: population based study. *BMJ* 2000, 320 (7233), 474-478.
 68. **Kroman N, Wohlfahrt J, Andersen KW i wsp.:** Parity, age at first childbirth and the prognosis of primary breast cancer. *Br J Cancer* 1998, 78 (11), 1529-1533.
 69. **Kulig E:** Receptor estrogenowy: budowa i funkcja w normalnej i neoplastycznej tkance. *Postępy Biochemii* 1994, 40 (4), 222-229.
 70. **Kuśkowski A, Towpik E (red.):** Zasady rozpoznawania i leczenia nowotworów. Wydawnictwo Polskiej Fundacji Europejskiej Szkoły Onkologii, Warszawa 1997.
 71. **Kuno K, Fukami A, Hori M i wsp.:** Factors affecting estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. *Gan No Rinsho* 1983, 29(6), 621-627.
 72. **Leibel SA., Phillips TL (red.):** Textbook of radiation oncology. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1998, 907-925.
 73. **Leone A, Flatow U, King CR i wsp.:** Reduced tumor incidence, metastatic potential and cytokine responsiveness of nm23 transfected melanoma cells. *Cell* 1991, 65, 25-35.
 74. **Leone A, Seeger RC, Hong CM i wsp.:** Evidence for nm23 RNA overexpression DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene* 1993, 8, 855-865.

75. **Love RR, Barden HS, Mazess RB i wsp.:** Effect of tamoxifen on lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women after 5 years. *Arch Intern Med* 1994, 154(22), 2585-2588.
76. **Maki HS, Hoehn JL:** Influence of estrogen receptors on survival and recurrence in patients with breast cancer without lymph node metastases. *Arch Surg* 1989, 124(3), 377-380.
77. **Mandai M, Konishi I, Koshiyama M i wsp.:** Expression of metastasis-related nm23-H1 and nm23-H2 genes in ovarian carcinomas: correlation with clinicopathology, EGFR, c-erbB-2 and c-erbB-3 genes, and sex steroid receptor expression. *Cancer Res* 1994, 54(7), 1825-1830.
78. **McDivitt RW, Stevens JA, Lee NC i wsp.:** Histologic types of benign breast disease and the risk of breast cancer. *Cancer* 1992, 69(9), 1408-1414.
79. **McGuire WL, Clark GM:** Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992, 326(32), 1756-1761.
80. **Merkle E, Seidl I, Bahr I i wsp.:** Long-term study of the significance of hormone receptors as prognostic factors in breast cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1990, 50(7), 528-532.
81. **Miller AB, To T, Baines CJ i wsp.** (For the Canadian National Breast Screening Study-2): Canadian National Breast Screening Study-2: 13-year results of a randomized trial in women aged 50-59 years. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92(18), 1490-1499.
82. **Morris VL, Tuck AB, Wilson SM i wsp.:** Tumor progression and metastasis in murine D2 hyperplastic alveolar nodule mammary tumor cell lines. *Clin Exp Metastasis* 1993, 11(1), 103-112.
83. **Muller W, Schneiders A, Hommel G i wsp.:** Expression of nm23 in gastric carcinoma: association with tumor progression and poor prognosis. *Cancer* 1998, 83 (12), 2481-2487.
84. **Nakayama T, Ohtsuru A, Nakao K i wsp.:** Expression in human hepatocellular carcinoma of nucleoside diphosphate kinase, a homologue of the nm23 gene product. *J Natl Cancer Inst* 1992, 84(17), 1349-1354.
85. **Nayfield SG, Karp JE, Ford LG i wsp.:** Potential role of tamoxifen in prevention of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991, 83(20), 1450-1459.
86. **Niwińska A:** Nowe czynniki prognostyczne u chorych na raka sutka bez przerzutów do węzłów chłonnych. *Nowotwory* 1995, 45, 459-469.
87. **Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF i wsp.:** Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994, 12 (5), 888-894.
88. **Olson SH, Zauber AG, Tang J i wsp.:** Relation of time since last birth and parity to survival of young women with breast cancer. *Epidemiology* 1998, 9(6), 669-671.
89. **Orłowska J:** Programy onkologicznych badań przesiewowych. *Gazeta Lekarska* 2000, 12(119), 44-45.
90. **Ostrowska B, Szala S:** Molekularne czynniki prognostyczne w raku sutka.

Nowotwory – Supplement 1993, 43, 75-82.

91. **Ostrowski JL, Sawan A, Henry L i wsp.:** p53 expression in human breast cancer related to survival and prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1991, 164(1), 75-81.
92. **Parkin DM:** Cancer of the breast, endometrium and ovary: geographic correlations. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989, 25(12), 1917-1925.
93. **Paterson AHG, Zuck VP, Szafran O i wsp.:** Influence and significance of certain prognostic factors on survival in breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1982, 18(10), 937-943.
94. **Pertschuk LP, Kim DS., Nayer K i wsp.:** Immunocytochemical estrogen and progesterone receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies. *Cancer* 1990, 66, 1663-1670.
95. **Qazi R, Chuang JL, Drobyski W:** Estrogen receptors and the pattern of relapse in breast cancer. *Arch Intern Med* 1984, 144(12), 2365-2367.
96. **Ravdin PM, Muss H, Dressler L i wsp.:** Breast cancer prognostic factors – the search goes on. *J Natl Cancer Inst* 1994, 86(7), 480-483.
97. **Remmele W, Stenger HE:** Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) fuer den immunohistochemischen Oestrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammarkarzinomgewebe. *Der Pathologe* 1987, 8, 138-140.
98. **Retsky M, Demicheli R, Hrushesky W:** Premenopausal status accelerates relapse in node positive breast cancer: hypothesis links angiogenesis, screening controversy. *Breast Cancer Res Treat* 2001, 65(3), 217-224.
99. **Rosen PR, Groshen S, Saigo PE i wsp.:** A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T2N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1989, 7(3), 355-366.
100. **Royds JA, Stephenson TJ, Rees JC i wsp.:** Nm23 protein expression in ductal carcinoma in situ and invasive human breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85(9), 727-731.
101. **Russel RL, Geisinger KR, Mehta RR i wsp.:** Nm23 – relationship to the metastatic potential of breast carcinoma cell lines, primary human xenografts and lymph node negative breast carcinoma patients. *Cancer* 1997, 79, 1158-65.
102. **Rutqvist LE, Mattsson A:** Cardiac and thromboembolic morbidity among postmenopausal women with early-stage breast cancer in a randomized trial of adjuvant tamoxifen. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85(17), 1398-1406.
103. **Sakamoto Y, Ishiguro M, Kitagawa G:** Akaike Information Criterion Statistics. D. Reidel Publishing Company, 1986.
104. **Samaan NA, Buzdar AU, Aldinger KA i wsp.:** Estrogen receptor: a prognostic factor in breast cancer. *Cancer* 1981, 47, 554-560.
105. **Sant M, Gatta G, Micheli A i wsp.:** Survival and age at diagnosis of breast cancer in a population-based cancer registry. *Eur J Cancer* 1991, 27(8),

981-984.

- 106. Sastre-Garau X, Lacombe ML, Jouve M i wsp.:** Nucleoside diphosphate kinase/nm23 expression in breast cancer: lack of correlation with lymph-node metastasis. *Int J Cancer* 1992, 50, 533-538.
- 107. Sawan A, Lascu I, Veron M i wsp.:** NDP-K/nm23nExpression in human breast cancer in relation to relapse, survival, and other prognostic factors: an immunohistochemical study. *J Pathol* 1994, 172, 27-34.
- 108. Schouten LJ, Hupperets PS, Jager JJ i wsp.:** Prognostic significance of etiological risk factors in early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1997, 43 (3), 217-223.
- 109. Semiglazov VF, Sagaidak VN, Moiseyenko VM i wsp.:** Study of the role of breast self-examination in the reduction of mortality from breast cancer: the Russian Federation/World Health Organization study. *Eur J Cancer* 1993, 29A(14), 2039-2046.
- 110. Silvestrini R, Daidone MG, Luisi A i wsp.:** Biologic and clinicopathologic factors as indicators of specific relapse types in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1995, 13 (3), 697-704.
- 111. Skinner JR, Wanebo HJ, Betsill WL Jr i wsp.:** Evaluation of the pathologic and prognostic correlates of estrogen receptors in primary breast cancer. *Ann Surg* 1982, 196(6), 636-641.
- 112. Slattery ML, Berry TD, Kerber RA:** Is survival among women diagnosed with breast cancer influenced by family history of breast cancer? *Epidemiology* 1993, 4 (6), 543-548.
- 113. Spiessl B (red.):** Atlas TNM. Warszawa, Sanmedica, 197-203, 1994.
- 114. Sporek R:** Application of cytology in diagnosing benign changes and breast cancers. *Med Sci Monit* 2000, 6 (2), 373-379.
- 115. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L i wsp.:** Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988, 80, 200-204.
- 116. Steeg PS, De La Rosa A, Flatow U i wsp.:** Nm23 and breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 1993, 25, 175-187.
- 117. Stewart FS, King RJB, Sexton SA i wsp.:** Oestrogen receptors, sites of metastatic disease and survival in recurrent breast cancer. *Europ J Cancer* 1981, 17(4), 449-453.
- 118. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S i wsp.:** The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *New England Journal of Medicine* 1997, 336(20), 1401-1408.
- 119. Teh W, Wilson AR:** The role of ultrasound in breast cancer screening. A consensus statement by the European Group for Breast Cancer Screening. *Eur J Cancer* 1998, 34(4), 449-450.
- 120. Thomas DB, Gao DL, Self SG i wsp.:** Randomized trial of breast self-examination in Shanghai: methodology and preliminary results. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89(5), 355-365.

121. **Thorpe SM, Christensen IJ, Rasmussen BB i wsp.:** Short recurrence-free survival associated with high oestrogen receptor levels in the natural history of postmenopausal, primary breast cancer. *Eur J Cancer* 1993, 29A(7), 971-7.
122. **Toikkanen SP, Kujari HP, Joensuu H:** Factors predicting late mortality from breast cancer. *Eur J Cancer* 1991, 27(5), 586-591.
123. **Tokunaga Y, Urano T, Furukawa K i wsp.:** Reduced expression of Nm23-H1, but not of Nm23-H2, is concordant with the frequency of lymph-node metastasis of human breast cancer. *Int J Cancer* 1993, 55, 66-71.
124. **Tomita M, Ayabe Y, Matsuzaki Y i wsp.:** Expression of nm23-H1 gene product in esophageal squamous cell carcinoma and its association with vessel invasion and survival. *BMC Cancer* 2001, 1, 3.
125. **Toulas C, Marek E, Cheutin F i wsp.:** Expression of nm23-H1 is related to metastasis free survival, tumor size and estrogen receptor level in human breast cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1994, 35, 224.
126. **Tubiana M, Koscielny S:** Natural history of human breast cancer: recent data and clinical implications. *Breast Cancer Res Treat* 1991, 18(3), 125-140.
127. **Ursin G, Ross RK, Sullivan-Halley J i wsp.:** Use of oral contraceptives and risk of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res Treat* 1998, 50(2), 175-184.
128. **Vázquez-Ramírez FJ, Gonzáles-Cámpora JJ, Hevia-Álvarez E i wsp.:** P-glycoprotein, metallothionein and nm23 protein expressions in breast carcinoma. *Pathol Res and Pract* 2000, 196, 553-559.
129. **Veronesi U, De Palo G, Marubini E i wsp.:** Randomized trial of fenretinide to prevent second breast malignancy in women with early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91(21), 1847-1856.
130. **Williams MR, Todd JH, Ellis IO i wsp.:** Oestrogen receptors in primary and advanced breast cancer: and eight year review of 704 cases. *Br J Cancer* 1987, 55(1), 67-73.
131. **Witek A:** Receptor estrogenowy – nadrodzina steroidowo-tarczycowego receptora hormonalnego. *Gin Pol* 2000, 71(2), 92-97.
132. **Wood WC:** Integration of risk factors to allow patient selection for adjuvant systemic therapy in lymph node-negative breast cancer patients. *World J Surg* 1994, 18, 39-44.
133. **Yamaguchi A, Urano T, Fushida S i wsp.:** Inverse association of nm23-H1 expression by colorectal cancer with liver metastasis. *Br J Cancer* 1993, 68 (5), 1020-1024.
134. **Yoshimoto M, Sakamoto G, Kitagawa T i wsp.:** Previous abortions exert favorable effects on the prognosis of breast cancer patients. *Gan No Rinsho* 1984, 30(7), 777-784.
135. **Zatoński W, Tyczyński J:** Nowotwory złośliwe w Polsce w 1996 roku. Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 1999, 33-62.

WYKAZ SKRÓTÓW

ACR	American College of Radiology
ACS	American Cancer Society
AJCC	American Joint Committee on Cancer
BCT	breast conserving therapy
BD	brak danych
BMI	indeks masy ciała
CD 31	cząsteczka adhezyjna 31
CD 44	cząsteczka adhezyjna 44
DCO	Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu
df	stopnie swobody
DFS	czas przeżycia bez objawów choroby nowotworowej
EGFR	receptor naskórkowego czynnika wzrostu
ER	receptor estrogenowy
HBOC	hereditary breast/ovarian cancer
Hpr	białko związane z haptoglobina
LR	receptor lamininowy
NCI	National Cancer Institute
NDP-K	dwufosforanowe kinazy nukleozydowe
NDP-kinazy	dwufosforanowe kinazy nukleozydowe
OS	całkowity czas przeżycia
PAI 1 i 2	inhibitory aktywatora plazminogenu 1 i 2
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
UICC	Union Internationale Contre Cancer
uPA i uPAR	aktywator plazminogenu o typie urokinazy i jego receptor
HSP70	białko szoku cieplnego
ILGF	insulino-podobny czynnik wzrostu

SPIS TABEL

Tabela I. Przeżycia 5-letnie w zależności od stopnia pierwotnego zaawansowania.	3
Tabela II. Współczynniki standaryzowane zachorowalności w Polsce i sąsiednich krajach europejskich.	5
Tabela III. Współczynniki standaryzowane zachorowalności w krajach wysoko rozwiniętych.	6
Tabela IV. Stopnie zaawansowania klinicznego.	17
Tabela V. Skala IRS (Immunreaktiven Score) wg Remmele w modyfikacji Remmele.	33
Tabela VI. Wiek chorych.	34
Tabela VII. Rozkład wieku chorych.	35
Tabela VIII. Wielkość guza.	36
Tabela IX. Rozkład wielkości guza.	37
Tabela X. Wartości BMI.	39
Tabela XI. Czas trwania okresu miesiączkowania w latach.	42
Tabela XII. Rozkład wartości czasu trwania okresu miesiączkowania w latach.	42
Tabela XIII. Liczba poronień.	43
Tabela XIV. Rozkład ilości poronień.	44
Tabela XV. Liczba porodów.	45
Tabela XVI. Rozkład ilości porodów.	45
Tabela XVII. Czas przeżycia całkowitego.	48
Tabela XVIII. Czas przeżycia całkowitego dla poszczególnych chorych.	49
Tabela XIX. Czas przeżycia wolnego od objawów choroby.	50
Tabela XX. Czas wykrycia nawrotu u poszczególnych chorych.	51
Tabela XXI. Nasilenie ekspresji receptora estrogenowego w skali IRS.	53
Tabela XXII. Rozkład nasilenia ekspresji receptora estrogenowego.	53
Tabela XXIII. Nasilenie ekspresji białka nm23-H1. Wartości podane są w półilościowej skali IRS.	54
Tabela XXIV. Rozkład nasilenia ekspresji białka nm23-H1.	55
Tabela XXV. Wynik analizy pierwszego modelu Coxa dla OS.	59
Tabela XXVI. Wyniki analizy modelu Coxa po jego redukcji metodą Akaike dla OS.	60
Tabela XXVII. Wynik analizy pierwszego modelu Coxa dla DFS.	67
Tabela XXVIII. Wyniki analizy modelu Coxa dla DFS po jego redukcji metodą Akaike.	68

SPIS RYCIN

Rycina 1. Przeżycia 5-letnie kobiet chorych na raka piersi zamieszkałych na Dolnym Śląsku.....	4
Rycina 2. Rozkład zachorowań w 5 – letnich grupach wiekowych w latach 1988-1992 na Dolnym Śląsku.....	7
Rycina 3. Wykres pudełkowy ilustrujący wiek chorych.....	35
Rycina 4. Wykres ilustrujący rozkład wieku chorych.....	36
Rycina 5. Wykres pudełkowy wielkości guza.....	37
Rycina 6. Diagram obrazujący rozkład wielkości guza.....	38
Rycina 7. Stopień złośliwości histologicznej guzów piersi wg Blooma-Richardsona.....	38
Rycina 8. Histogram obrazujący stan pachowych węzłów chłonnych oceniony na podstawie badania histopatologicznego.....	39
Rycina 9. Wykres pudełkowy wartości BMI.....	40
Rycina 10. Histogram częstości obrazujący stan odżywienia.....	40
Rycina 11. Wykres słupkowy obrazujący rozkład BMI.....	41
Rycina 12. Stan hormonalny pacjentek.....	41
Rycina 13. Wykres pudełkowy obrazujący czas trwania okresu miesiączkowania.....	42
Rycina 14. Wykres słupkowy obrazujący rozkład czasu trwania okresu miesiączkowania.....	43
Rycina 15. Liczba poronień w badanej grupie chorych.....	44
Rycina 16. Wykres słupkowy obrazujący liczbę poronień.....	45
Rycina 17. Liczba porodów w badanej grupie chorych.....	46
Rycina 18. Wykres słupkowy obrazujący liczbę porodów.....	46
Rycina 19. Wykres pudełkowy ilustrujący czas przeżycia całkowitego.....	48
Rycina 20. Rozkład czasu przeżycia pacjentek.....	50
Rycina 21. Wykres pudełkowy ilustrujący DSF.....	51
Rycina 22. Rozkład DFS chorych z rakiem piersi.....	52
Rycina 23. Wykres pudełkowy obrazujący wartości nasilenia ekspresji receptora estrogenowego oznaczone w półilościowej skali IRS.....	53
Rycina 24. Wykres obrazujący rozkład ekspresji receptora estrogenowego.....	54
Rycina 25. Wykres pudełkowy obrazujący wartości nasilenia ekspresji białka nm23-H1 oznaczane w półilościowej skali IRS.....	55
Rycina 26. Diagram obrazujący rozkład ekspresji białka nm23-H1.....	56
Rycina 27. Wykres pudełkowy przedstawiający zależność pomiędzy OS a ER oraz „wartość odstającą” ER w grupie pacjentek, które zmarły.....	57
Rycina 28. Histogram obrazujący zależność pomiędzy OS a liczbą poronień.....	62

Rycina 29. Histogram obrazujący zależność pomiędzy OS a stopniem zaawansowania klinicznego.....	63
Rycina 30. Histogram obrazujący zależność pomiędzy OS a stanem hormonalnym chorych.	64
Rycina 31. Wykres ilustrujący zależność pomiędzy OS a stanem węzłów chłonnych pachowych.	65
Rycina 32. Wykres ilustrujący zależność pomiędzy OS a nasileniem ekspresji receptora estrogenowego.	65
Rycina 33. Wykres ilustrujący zależność pomiędzy ekspresją ER i nm23.....	70
Rycina 34. Wykresy pudełkowe ilustrujące zależność pomiędzy ER i zmiennymi dyskretnymi. Poziom ekspresji receptora estrogenowego znajduje się na osi pionowej.	72
Rycina 35. Wykresy punktowe ilustrujące zależność pomiędzy nasileniem ekspresji ER i zmiennymi typu ciągłego.	75
Rycina 36. Wykresy pudełkowe ilustrujące zależność pomiędzy białkiem nm23-H1 i zmiennymi dyskretnymi. Poziom ekspresji nm23 znajduje się na osi pionowej.....	77
Rycina 37. Wykresy punktowe ilustrujące zależność pomiędzy nasileniem ekspresji białka nm23-H1 i zmiennymi typu ciągłego.	80