

Wojciech Kuncman¹ [ORCID: 0000-0003-1117-4463]

Magdalena Orzechowska² [ORCID: 0000-0002-8301-8059]

Katarzyna Taran³ [ORCID: 0000-0002-0598-9079]

Radziśław Kordek¹ [ORCID: 0000-0003-4724-3627]

1. Zakład Patologii, Katedra Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
2. Zakład Kancerogenezy Molekularnej, Katedra Medycyny Molekularnej i Biotechnologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
3. Zakład Patomorfologii, Pracownia Frakcjonowania Izotopowego w Procesach Patologicznych, Katedra Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

EKSPRESJA GENU KODUJĄCEGO GROSS CYSTIC DISEASE FLUID PROTEIN 15 (GCDFP-15) W PIERWOTNYCH I PRZERZUTOWYCH OGNISKACH RAKA PIERSI

Autor korespondencyjny:

Katarzyna Taran, Zakład Patomorfologii, Pracownia Frakcjonowania Izotopowego w Procesach Patologicznych, Katedra Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź, e-mail: katarzyna.taran@umed.lodz.pl

Streszczenie

Wprowadzenie: Heterogenność jest charakterystyczną cechą biologii raków piersi. Dotychczasowe badania w tym zakresie w większości obejmują uznane czynniki prognostyczne i predykcyjne, jednakże najistotniejsza dla procesu przerzutowania może okazać się ewaluacja ekspresji mniej znanych białek.

Materiały i metody: Immunohistochemiczna ocena ekspresji białka GCDFP-15 i potencjalnej heterogenności guzów pierwotnych i przerzutów w pachowych węzłach chłonnych w raku piersi.

Wyniki: Stwierdzono zróżnicowanie ekspresji GCDFP-15 w obrębie ognisk pierwotnych i przerzutowych raka piersi, a ponadto dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją badanego białka, a obecnością Ki-67 oraz siłą ekspresji receptorów progesteronowych w przerzutach raka sutka.

Wnioski: Heterogenność przerzutowych ognisk raka piersi obejmuje ekspresję GCDFP-15. Ujawnione korelacje pomiędzy ekspresją tego białka a uznanymi czynnikami o znaczeniu rokowniczym przemawiają za ewaluacją zajętych w przebiegu choroby nowotworowej węzłów chłonnych jako cennym uzupełnieniem oceny guza pierwotnego. Rola białka GCDFP-15 w procesie przerzutowania w raku sutka wymaga dalszych badań ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów odpowiedzi immunologicznej.

Słowa kluczowe: rak piersi, białko GCDFP-15, przerzutowanie, układ odpornościowy

Wprowadzenie

Raki piersi wyróżniają się spośród innych nowotworów swoją heterogennością. Cecha ta znajduje odzwierciedlenie w obecnie stosowanej klasyfikacji guzów piersi Światowej Organizacji Zdrowia: wyróżniono tu aż 10 głównych typów morfologicznych raka wywodzącego się z komórek wewnętrznej warstwy przewodów piersiowych (komórek luminalnych) wraz z podtypami, a ponadto typy rzadkie oraz raki mioepitelialne [1].

Wyniki badań ekspresji białek o uznanym znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym są rozbieżne zarówno w przypadku samego guza pierwotnego, jak i pomiędzy ogniskiem pierwotnymi a przerzutowymi. Badania obejmują przede wszystkim uznane czynniki prognostyczne i predykcyjne, w pierwszym rzędzie: receptor estrogenowy – ER, receptor progesteronowy – PR oraz białko HER2. Pomimo różnic metodologicznych większość uzyskanych wyników potwierdza występowanie heterogenności guza pierwotnego i ognisk przerzutowych. Zazwyczaj heterogenność jest największa w przypadku PR (29–53%), pośrednia w przypadku ER (13–54%), a najmniejsze zmiany dotyczą HER2 (0–32%) [2–7]. W przypadku badań heterogenności przerzutów w stosunku do guza pierwotnego zwraca się uwagę na konieczność uwzględnienia lokalizacji zmian oraz ich synchroniczności lub sekwencyjności z uwagi na fakt, że nowotwór zmienia się nie tylko w czasie, lecz wykazuje również charakterystyczne zmiany w zależności od miejsca przerzutowania [8]. Badania innych białek są zdecydowanie rzadsze i obejmują guzy pierwotne (heterogenność wewnętrzna). Podkreśla się jednak, że kluczowe dla poznania biologii raka sutka i najistotniejsze dla procesu przerzutowania mogą okazać się badania różnic ekspresji białek innych niż predykcyjne [9].

Glikoproteina GCDFP-15 (ang. *gross cystic disease fluid protein 15*), znana także jako prolactin-inducible protein (PIP), extra-parotid glycoprotein (EP-GP), gp17 seminal actin-binding protein (SABP) oraz BRST2, to białko

pierwotnie opisane w gruczole piersiowym, lecz występujące w wielu gruczołach typu apokrynowego. Obecność GCDFP-15 wykrywana jest w gruczołach skóry okolicy pachowej i sromowej, powiek, przewodu słuchowego, tkanki podśluzowej oskrzeli, gruczołów ślinowych i łzowych oraz w pęcherzykach nasiennych.

Podstawową funkcją białka GCDFP-15 jest regulacja transportu wody w komórkach poprzez łączenie się z immunoglobulinami IgG, z niektórymi gatunkami bakterii oraz z CD4 [10]. Prawidłowo rozwinięta tkanka gruczolowa piersi wykazuje niską ekspresję GCDFP-15, natomiast znaczna część raków tego gruczołu wykazuje jego nadekspresję. Ekspresja ta jest szczególnie wysoka w rakach gruczolowych z cechami różnicowania apokrynowego [11], natomiast znacznie niższa w przypadku nowotworów o dużym stopniu zaawansowania klinicznego lub raków piersi niskoróżnicowanych [12].

W praktyce klinicznej białko to najczęściej wykorzystywane jest jako element diagnostyki różnicowej w procesie poszukiwania lokalizacji ogniska pierwotnego w przebiegu choroby nowotworowej. Obecność immunohistochemicznej ekspresji GCDFP-15 w połączeniu z morfologią raka gruczolowego sugeruje w pierwszym rzędzie gruczoł piersiowy jako punkt wyjściowy procesu [13], należy jednak mieć na uwadze występowanie GCDFP-15 w rakach gruczołu krokowego, gruczołów potowych lub ślinowych [14,15]. Celem pracy była ewaluacja ekspresji GCDFP-15 w pierwotnych i przerzutowych ogniskach nowotworowych oraz poszukiwanie potencjalnych implikacji klinicznych takich oznaczeń w raku piersi.

Materialy i metody

Na podstawie zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi RNN/12/16/KE grupa badana objęła 67 pacjentek z obecnością pierwotnego raka piersi z przerzutami w węzłach chłonnych pachowych (pN1–N2), klinicznie bez przerzutów odległych (cM0) oraz bez obecności przerzutów w pozapachowych węzłach chłonnych. Materiał tkankowy z gruczołu piersiowego i węzłów chłonnych pachowych, pozyskany w trakcie standardowych procedur chirurgicznych, utrwalano od 24 do 48 godzin w 10-procentowym roztworze zbuforowanej formaliny w temperaturze pokojowej. Podczas rutynowego badania makroskopowego pobrano z materiału pooperacyjnego wycinki do badań. Uzyskane tkanki zostały poddane działaniu substancji chemicznych w procesorze tkankowym Excelsior™ AS ThermoFisher według schematu: 8 godzin w wymienianych roztworach etanolu o rosnącym stężeniu (70–99%), 2 godziny w wymienianym roztworze ksyleny oraz 2 godziny w parafinie histologicznej o temperaturze 58°C, a następnie zatopione w bloczkach parafinowych. Z bloczków tych wykonano skrawki o grubości 4–5 µM, które po

odparafinowaniu zabarwiono w sposób rutynowy hematoksyliną i eozyną oraz wykorzystano do dalszych badań, przewidzianych zarówno standardowymi protokołami w przypadku raka piersi, jak i do immunohistochemicznej ewaluacji ekspresji GCDFP-15. Z zastosowaniem procedury cieplnego odmaskowania epitopu (HIER) przy użyciu aparatu Dako PT Link odsłonięto antygen barwienia immunohistochemicznego zgodnie ze standardową procedurą z wykorzystaniem przeciwciał Dako (*ready to use*) oraz zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta przeciwciała i danymi zawartymi w tabeli 1.

Tabela 1. Szczegóły procedury badań immunohistochemicznych ekspresji białka GCDFP-15

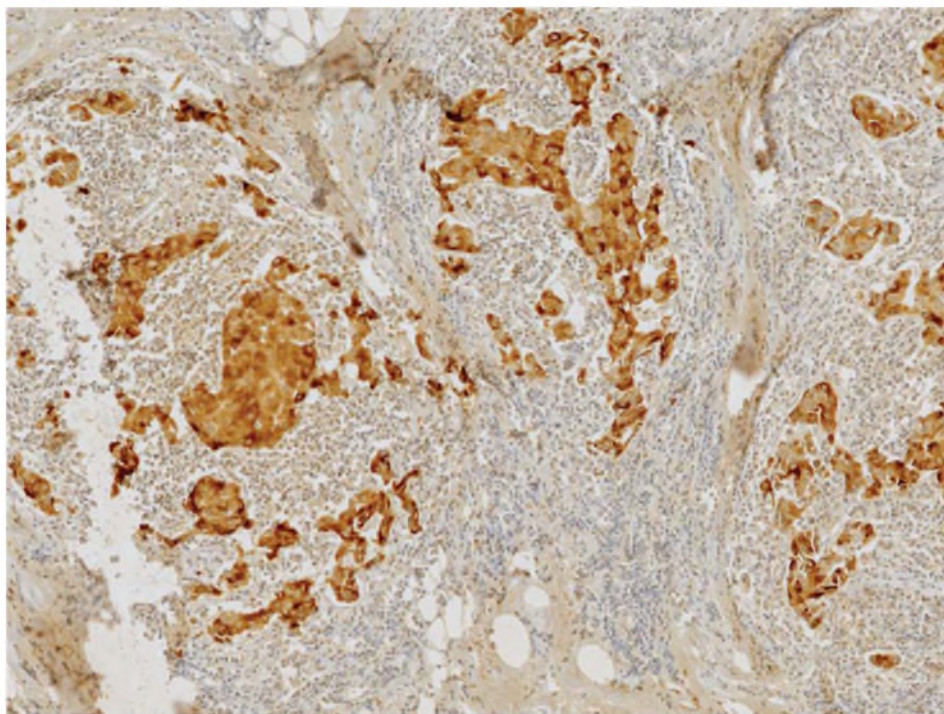
Nazwa przeciwciała	Producent	Stężenie	Czas inkubacji	Sposób odsłonięcia antygeny	Sposób oceny preparatów
GCDFP-15	Dako/ Agilent	ready to use	30'	PT link pH 8,0 20'	Ocena intensywności (skala: od 0 do +3)

Dla celów badania intensywność reakcji barwnej w odczynach immunohistochemicznych oceniano przy pomocy umownej skali czterostopniowej (0, +1, +2, +3). Wyniki tej ewaluacji poddano analizie statystycznej. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego STATISTICA 12.5 (StatSoft, Tulsa, OK, USA, [JKKP501E504328AR-F]) z zasobów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W pierwszym etapie przeprowadzono test Shapiro-Wilka, a w kolejnych etapach analizy wykorzystano testy nieparametryczne. Dla oznaczenia istotności różnic statystycznych wykorzystano test Manna-Whitneya-Wilcozona. Korelacje między parametrami obliczono korzystając ze współczynnika Pearsona (r). Poziom istotności (p) uznawano za statystycznie znamienne, gdy jego wartość wynosiła $<0,05$.

Wyniki

Wyniki badań ekspresji białka GCDFP15 w guzie pierwotnym i synchronicznych przerzutach do pachowych węzłów chłonnych przedstawiają się następująco:

1. Obecność ekspresji GCDFP15 stwierdzono w 67% guzów pierwotnych oraz 60% przerzutów w węzłach chłonnych pachowych (fot. 1).



Fot. 1. Ekspresja GCDFP15 w komórkach raka piersi w materiale tkankowym z przerzutu do węzła chłonnego, ocena: +3 w skali intensywności, chora lat 48, nowotwór sutka o drugim stopniu złośliwości histologicznej (G2) (powiększenie 200x)

2. Wyniki badań intensywności ekspresji GCDFP15 w guzach pierwotnych oraz przerzutach do pachowych węzłów chłonnych w grupie badanej przedstawia tabela 2:

Tabela 2. Porównanie intensywności ekspresji GCDFP15 w guzach pierwotnych oraz przerzutach do pachowych węzłów chłonnych w raku piersi

Intensywność barwienia	Guz pierwotny	Przerzut
0	21 (33%)	21 (40%)
+1	23 (36%)	18 (35%)
+2	15 (23%)	11 (21%)
+3	5 (8%)	2 (4%)
Suma:	64 (100%)	52 (100%)

Ekspresję GCDFP-15 w guzie pierwotnym i w synchronicznych przerzutach do węzłów chłonnych pachowych ewaluowano w 50 przypadkach. Różnice pod względem siły ekspresji odnotowano u 24 pacjentów (48%), w większości zmiany wynosiły +1/-1. Jedynie u 3 pacjentów (6%) odnotowano spadek ekspresji w przerzucie o dwa pkt, a u jednej chorej (2%) – wzrost o 3 pkt. Średnia bezwzględna wartość różnicy ekspresji wyniosła 0,58 pkt. Zaobserwowano dwukierunkowy charakter całkowitych zmian ekspresji GCDFP-15. W ośmiu przypadkach (16%) stwierdzono całkowity zanik ekspresji GCDFP-15 w przerzucie, z kolei u 8 chorych (16%) ekspresja pojawiła się w przerzucie *de novo*.

3. Ocena heterogenności guza pierwotnego i synchronicznych przerzutów w węzłach chłonnych pachowych pod względem ekspresji GCDFP-15 oraz analiza statystyczna wyników ewaluacji

W badaniach guzów pierwotnych stwierdzono różnicę ekspresji GCDFP-15 pomiędzy ogniskami pierwotnymi i przerzutowymi, natomiast nie ujawniono związków immunoekspresji badanego białka z uznanymi czynnikami o znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym. Rozkład wartości zmiennej nie okazał się zgodny z rozkładem normalnym. Z tego względu dokonano analizy statystycznej z użyciem testu Manna-Whitneya-Wilcoxon, która nie ujawniła znamienności statystycznej obserwowanych różnic ekspresji badanego białka pomiędzy guzem pierwotnym a przerzutami ($p = 0,76$), jednakże w obrębie samych ognisk przerzutowych badania z wykorzystaniem współczynnika korelacji Pearsona ukazały zarówno dodatnią korelację pomiędzy ekspresją GCDFP-15 a indeksem komórek Ki-67 dodatnich w przerzucie ($r = 0,34$; $p = 0,026$), jak i dodatnią korelację pomiędzy siłami ekspresji GCDFP-15 i receptorów progesteronowych (PR) ($r = 0,31$, $p = 0,037$).

Dyskusja

Niezadawalające wyniki leczenia raka piersi są przyczyną intensyfikacji badań nad heterogennością tego nowotworu, który w coraz większym stopniu obejmuje białka o gorzej poznanych funkcjach, np.: EGFR, c-myc czy cykliny-D1. W najnowszych pracach badawczych z wykorzystaniem spektrometrii mas, obecnie najnowocześniejszej techniki analitycznej o najwyższej udokumentowanej wiarygodności i precyzji, ujawniono znaczne różnice pomiędzy węzłami chłonnymi a guzem pierwotnym pod względem białek odpowiedzialnych za procesy adhezji komórkowej oraz związanych z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym; największą heterogenność wykazano w przypadku ATP1F1 and β -tubuliny [16,17–19].

W prezentowanej pracy wykazano zróżnicowanie ekspresji GCDFP-15 w pierwotnych i przerzutowych ogniskach raka piersi; co szczególnie interesują-

ce – w przebiegu choroby nowotworowej może dochodzić do całkowitego zaniku ekspresji w przerzutach lub pojawiania się jej *de novo* pomimo jej braku w guzie pierwotnym. GCDFP-15 cechuje duża swoistość dla komórek raka piersi, co uzasadnia wykorzystanie jego immunohistochemicznej ewaluacji do potwierdzania pochodzenia raków gruczołowych o nieznanym ognisku pierwotnym [20–22]. Białko to częściej występuje w nowotworach wyżej zróżnicowanych i wykazujących cechy różnicowania apokrynowego, natomiast w przypadku nowotworów niskozróżnicowanych nie musi być obecne [11,12]. Udokumentowano także, że ekspresję GCDFP-15 obserwuje się podczas aktywnego wydzielania, będącego typową cechą różnicowania nabłonkowego [23]. W kontekście wyników prezentowanych badań pojawia się pytanie na temat zmian ekspresji GCDFP-15 w przebiegu choroby nowotworowej oraz potencjalnego związku ekspresji tego białka z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym. Bhargava i wsp. porównywali pod względem ekspresji mammaglobiny oraz GCDFP-15 dwa ogniska (guz pierwotny oraz przerzut) w grupie 29 pacjentów, jako część większego projektu; niestety, wyniki ograniczono do informacji, iż ekspresje te były ze sobą zbieżne, pokazano jednak przypadek, w którym ekspresje odnotowano jedynie w jednej z badanych lokalizacji (przerzut) [24]. Największe i najaktualniejsze badanie ekspresji białek w raku piersi, w którym poddano ocenie także GCDFP-15, dotyczyło 993 pacjentów. You-Bi Ni i wsp. analizowali czułości GCDFP-15 w guzie pierwotnym, w przerzutach odległych oraz w 254 przerzutach do węzłów chłonnych. W guzie pierwotnym ekspresję GCDFP-15 stwierdzono w 237 z 993 przypadków (23,9%), w przerzucie węzłowym w 59 z 254 przypadków (22,2%), a w przerzucie odległym w 13 z 23 przypadków (56,6%). Zbieżność wyników guza pierwotnego z przerzutem węzłowym wynosiła 81,5%, a z przerzutem odległym – 80%. Konwersja nieco częściej dotyczyła pojawienia się białka w przerzucie w przypadku węzła chłonnego (26 vs 22) w porównaniu z przerzutem odległym (2 vs 0). W badaniu nie zostały jednak zawarte analizy statystyczne, np. dla prób sparowanych, przez co nie można w pełni określić znaczenia powyższych obserwacji [20].

W literaturze przedmiotu ekspresja GCDFP-15 w przerzutach i guzach pierwotnych zazwyczaj jest zbliżona i waha się w granicach 32–47%, w jednym z badań uzyskano jednak wynik znacząco różny – 11% [21,22,25,26]. Istnienie rozbieżności można przypisać różnym przeciwiałom wykorzystywanym w pracach badawczych oraz odrębnej metodyce samego badania. Ekspresja GCDFP-15 zwykle nie jest intensywna i ma ogniskowy charakter. W prezentowanych badaniach ekspresja w guzie pierwotnym była wysoka i zbliżona do wartości stwierdzanych w przerzutach, co można tłumaczyć znaczącą liczbą raków przewodowych (NST) wysoko zróżnicowanych w grupie badanej. Heterogenność w obrębie ognisk w większości mieściła się w niewielkich granicach +1/-1, jednak całkowita zmiana ekspresji została odnotowana w zaskakująco dużej – w stosunku do przewidywań – liczbie przypadków. Ze względu

na bardzo małą liczbę dostępnych w literaturze badań oraz zróżnicowaną metodykę trudno dokonać jednoznacznych porównań, niemniej można wnioskować o istnieniu heterogenności i dwukierunkowości obserwowanych zmian ekspresji GCDFP-15.

Stwierdzenie obecności przerzutów wiąże się z najpoważniejszym rokowaniem dla pacjenta [12]. Ponad 90% zgonów osób z chorobą nowotworową wywołanych jest przez przerzuty odległe [27]. Rak piersi w stadium z przerzutami odległymi (M1) zazwyczaj jest nieuleczalny, a konwencjonalna chemioterapia ma jedynie znaczenie paliatywne [28].

Proces przerzutowania jest zjawiskiem długotrwałym i złożonym. Już we wczesnych etapach rozwoju guza pierwotnego obecne są we krwi krążące komórki nowotworowe [29]. Dzisiejszy poziom wiedzy nie pozwala na skuteczne przewidzenie pojawienia się i lokalizacji przerzutów. Ponadto guzy różnią się między sobą drogami rozwoju i zaangażowaniem różnych mechanizmów molekularnych w naturalnym przebiegu choroby nowotworowej [30]. Poszczególne ogniska nowotworowe przez swoją niestabilność są niejednorodne pod względem genetycznym, epigenetycznym oraz biologicznym, a u pojedynczego chorego występują liczne subpopulacje komórkowe o różnej charakterystyce [8,31].

Obecność GCDFP-15 wiązana jest z lepszym przebiegiem choroby nowotworowej [25,32]. Wzrost ekspresji GCDFP-15 jest wywoływany przez aktywność receptorów glikokortykosteroidowych, androgenowych, progesteronowych i prolaktynowych, hormonu wzrostu oraz cytokin (IL-1 α , IL-4, IL-13), obniżenie ekspresji jest natomiast wywoływane przez aktywność receptora estrogenowego oraz IL-6. Głównym mediatorem regulującym ekspresję GCDFP-15 jest szlak powiązany ze STAT5 [23]. Ujawniony w prezentowanych badaniach związek ekspresji GCDFP-15 w guzach przerzutowych z uznanymi czynnikami oznaczeniu prognostycznym i predykcyjnym – Ki-67 oraz PR rzuca nowe światło na złożone mechanizmy przerzutowania w raku piersi.

Ki-67 jest białkiem zlokalizowanym w jądrze komórkowym i występującym we wszystkich fazach podziału komórkowego (G1, S, G2, M), nie występuje natomiast w fazie spoczynku komórki (G0) [33,34]. Stężenie Ki-67 ulega zmianom, osiągając najwyższy poziom podczas mitozy. Białko to bezpośrednio i w sposób uniwersalny powiązane jest z aktywnością podziałów komórkowych oraz agresywnością i przebiegiem wszystkich nowotworów złośliwych [35]. W raku piersi Ki-67 ma kluczowe znaczenie dla podziału raków podobnych do luminalnych na podtypy A i B, a przez to dla planowania terapii systemowej [36]. Dotychczas nie udowodniono istnienia związku przyczynowo-skutkowego pomiędzy poziomem białka Ki-67 a aktywnością szlaku PR.

Ocena receptora progesteronowego, dokonywana z wykorzystaniem immunohistochemii zgodnie z modelem Allred, służy w praktyce klinicznej odróżnianiu raków podobnych do luminalnych A i B (*luminal-like*). Według

europejskich wytycznych obecność ekspresji PR w więcej niż 20% komórek charakteryzuje podtyp podobny do luminalnego A [12], co przekłada się na istotne korzyści z zastosowania terapii systemowej. Najważniejszymi efektami pobudzenia PR jest zwiększenie potencjału proliferacyjnego oraz mobilności komórek nowotworowych. Mechanizm wiążący PR z czynnikami proproliferacyjnymi nie został do tej pory rozpoznany. Przypuszcza się, że reakcja ta jest złożona i przebiega najprawdopodobniej poprzez regulację zarówno ekspresji ER, jak i białek efektorowych PR. Intrygującą obserwacją jest wyhamowywanie ekspresji ER po pobudzeniu PR w modelach komórkowych. Na jej podstawie została oparta hipoteza stymulującego działania pobudzonego PR. W rakach piersi ER pełni rolę supresyjną w stosunku do większości innych czynników wzrostu (np. EGFR) – pobudzenie aktywności PR, a następnie wyhamowanie ekspresji i aktywności ER umożliwia ujawnienie silniejszych czynników wzrostu, wywołując zwiększenie potencjału proliferacyjnego. W sprzeczności z powyższą hipotezą może jednakże pozostawać fakt rzadkiego występowanie raków o profilu ekspresyjnym ER-, PR+, który powinien być typowy dla raków luminalnych B [37,38].

Najnowsze badania wskazują, że GCDFP-15 wykazuje związek z układem odpornościowym, a w szczególności z mechanizmami nieswoistej odpowiedzi immunologicznej [39]. Wydaje się to niezwykle interesujące w aspekcie prezentowanych wyników i korelacji dotyczących ekspresji GCDFP-15 zaobserwowanych jedynie po uogólnieniu się choroby nowotworowej, w ogniskach przerzutowych raka piersi. Obszar badań układu immunologicznego w ewaluowanym nowotworze dynamicznie rozwija się w ciągu ostatnich lat z powodu zmiany paradygmatu braku immunogenności raka piersi. Obecnie istnieją dowody aktywności adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej, a wyniki najnowszych badań sugerują, że naciek limfocytarny w podścielisku guza jest silnym korzystnym czynnikiem rokowniczym. Rola ekspresji białka GCDFP-15 w tych mechanizmach nie jest jednak rozpoznana.

Wnioski

Heterogenność pierwotnych i przerzutowych ognisk raka piersi obejmuje ekspresję GCDFP-15. Ujawnione w prezentowanych badaniach korelacje pomiędzy ekspresją tego białka a uznanymi czynnikami o znaczeniu rokowniczym w przerzutach przemawiają za ewaluacją zajętych w przebiegu choroby nowotworowej węzłów chłonnych jako cennym uzupełnieniem badań guza pierwotnego. Rola białka GCDFP-15 w procesie przerzutowania w raku sutka wymaga dalszych badań ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów odpowiedzi immunologicznej.

Bibliografia

1. Sinn H-P, Kreipe H. *A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition*. Breast Care. 2013; 8 (2): 149–154.
2. Amir E, Miller N, Geddie W, Freedman O, Kassam F, Simmons C, Oldfield M, Dranitsaris G, Tomlinson G, Laupacis A, Tannock IF, Clemons M. *Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer*. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2012; 30 (6): 587–592.
3. Liu J, Deng H, Jia W, Zeng Y, Rao N, Li S, Jin L, Wu J, Song E, Su F. *Comparison of ER/PR and HER2 statuses in primary and paired liver metastatic sites of breast carcinoma in patients with or without treatment*. J Cancer Res Clin Oncol. 2012; 138 (5): 837–842.
4. Curtit E, Nerich V, Mansi L, Chaigneau L, Cals L, Villanueva C, Bazan F, Montcuquet P, Meneveau N, Perrin S, Algros MP, Pivot X. *Discordances in estrogen receptor status, progesterone receptor status, and HER2 status between primary breast cancer and metastasis*. The Oncologist. 2013; 18 (6): 667–674.
5. Niikura N, Liu J, Hayashi N, Mittendorf EA, Gong Y, Palla SL, Gonzalez-Angulo AM, Hortobagyi GN, Ueno NT. *Loss of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression in metastatic sites of HER2-overexpressing primary breast tumors*. J Clin Oncol. 2012; 30 (6): 593–599.
6. Arslan C, Sari E, Aksoy S, Altundag K. *Variation in hormone receptor and HER-2 status between primary and metastatic breast cancer: review of the literature*. Expert Opin Ther Targets. 2011; 15 (1): 21–30.
7. Joseph C, Papadaki A, Althobiti M, Alsaleem M, Aleskandarany MA, Rakha EA. *Breast cancer intratumour heterogeneity: current status and clinical implications*. Histopathology. 2018; 73 (5): 717–731.
8. Turashvili G, Brogi E. *Tumor heterogeneity in breast cancer*. Front Med. 2017; 4: 227.
9. Kurbasic E, Sjöström M, Krogh M, Folkesson E, Grabau D, Hansson K, Rydén L, Waldemarson S, James P, Niméus E. *Changes in glycoprotein expression between primary breast tumour and synchronous lymph node metastases or asynchronous distant metastases*. Clin Proteomics. 2015; 12 (1): 13.
10. Bergamo P, Balestrieri M, Cammarota G, Guardioli J, Abrescia P. *CD4-mediated anchoring of the seminal antigen gp17 onto the spermatozoon surface*. Hum Immunol. 1997; 58 (1): 30–41.
11. Ward HWC. *Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels*. Br Med J. 1973; 1 (5844): 13–14.
12. Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, Zankrisson S, Cardoso F, ESMO Guidelines Committee. *Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2015; 26 Suppl 5: v8–30.
13. Monteagudo C, Merino MJ, LaPorte N, Neumann RD. *Value of gross cystic disease fluid protein-15 in distinguishing metastatic breast carcinomas among poorly differentiated neoplasms involving the ovary*. Hum Pathol. 1991; 22 (4): 368–372.

14. Tian W, Osawa M, Horiuchi H, Tomita Y. *Expression of the prolactin-inducible protein (PIP/GCDFP15) gene in benign epithelium and adenocarcinoma of the prostate.* *Cancer Sci.* 2004; 95 (6): 491–495.
15. Wick MR, Lillemoe TJ, Copland GT, Swanson PE, Manivel JC, Kiang DT. *Gross cystic disease fluid protein-15 as a marker for breast cancer: immunohistochemical analysis of 690 human neoplasms and comparison with alpha-lactalbumin.* *Hum Pathol.* 1989; 20 (3): 281–287.
16. Nassar A, Radhakrishnan A, Cabrero IA, Cotsonis GA, Cohen C. *Intratumor heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study.* *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* 2010; 18(5): 433–441.
17. Chhieng DC, Frost AR, Niwas S, Weiss H, Grizzle WE, Beeken S. *Intratumor heterogeneity of biomarker expression in breast carcinomas.* *Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm.* 2004; 79 (1): 25–36.
18. Glöckner S, Buurman H, Kleeberger W, Lehmann U, Kreipe H. *Marked intratumoral heterogeneity of c-myc and cyclinD1 but not of c-erbB2 amplification in breast cancer.* *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2002; 82 (10): 1419–1426.
19. Focke CM, Decker T, van Diest PJ. *Intratumor heterogeneity of Ki67 expression in early breast cancers exceeds variability between individual tumours.* *Histopathology.* 2016; 69 (5): 849–861.
20. Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. *Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse.* *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2010; 28 (10): 1684–1691.
21. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK. *Diseases of the breast: Fifth edition.* Wolters Kluwer Health Adis (ESP); 2014; <https://miami.pure.elsevier.com/en/publications/diseases-of-the-breast-fifth-edition> [dostęp: 20.07.2019].
22. Creighton CJ. *The molecular profile of luminal B breast cancer.* *Biol Targets Ther.* 2012; 6: 289–297.
23. *Rak piersi. Klasyfikacja TNM;* <http://www.mp.pl/social/article/52138> [dostęp: 16.09.2019].
24. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D. *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 (14): 8418–8423.
25. Cancer Genome Atlas Network. *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours.* *Nature.* 2012; 490 (7418): 61–70.
26. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. *Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer.* *Am J Pathol.* 2013; 183 (4): 1113–1124.
27. Khan N, Mukhtar H. *Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea.* *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29 (3): 435–445.
28. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL, Ziegler LD, Frye DK, Buzdar AU. *Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer.* *J Clin Oncol.* 1996; 14 (8): 2197–2205.
29. Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmüller G, Klein CA. *Systemic spread is an early step in breast cancer.* *Cancer Cell.* 2008; 13 (1): 58–68.

30. Liotta LA, Kohn EC. *Cancer's deadly signature*. Nat Genet. 2003; 33(1): 10–11.
31. Badve S, Gökmen-Polar Y. *Tumor Heterogeneity in breast cancer*. Adv Anat Pathol. 2015; 22 (5): 294–302.
32. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature. 2000; 406 (6797): 747–752.
33. Shirendeb U, Hishikawa Y, Moriyama S, Win N, Thu MMM, Mar KS, Khatanbaatar G, Masuzaki H, Koji T. *Human papillomavirus infection and its possible correlation with p63 expression in cervical cancer in Japan, Mongolia, and Myanmar*. Acta Histochem Cytochem. 2009; 42 (6): 181–190.
34. Hooghe B, Hulpiau P, van Roy F, De Bleser P. *ConTra: a promoter alignment analysis tool for identification of transcription factor binding sites across species*. Nucleic Acids Res. 2008; 36: 128–132.
35. Klöppel G, Perren A, Heitz PU. *The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification*. Ann N Y Acad Sci. 2004; 1014 (April): 13–27.
36. Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. *Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients*. Breast Cancer Res Treat. 2015; 153 (3): 477–491.
37. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, Serandour AA, Birrell SN, Bruna A, Saadi A, Menon S, Hadfield J, Pugh M, Raj GV, D'Santos C, Robinson JL, Silva G, Launchbury R, Perou CM, Stingl J, Caldas C, Tilley WD, Carroll JS. *Progesterone receptor modulates ERα action in breast cancer*. Nature. 2015; 523 (7560): 313–317.
38. Zheng Z-Y, Bay B-H, Aw S-E, Lin VC-L. *A novel antiestrogenic mechanism in progesterone receptor-transfected breast cancer cells*. J Biol Chem. 2005; 280 (17): 17480–17487.
39. Urbaniak A, Jablonska K, Podhorska-Okolow M, Ugorski M, Dziegiel P. *Prolactin-induced protein (PIP) – characterization and role in breast cancer progression*. Am J Cancer Res. 2018; 8 (11): 2150–2164.

Gross cystic disease fluid protein 15 (GCDFP-15) expression in primary and metastatic breast cancer foci

Abstract

Introduction: Heterogeneity is a characteristic feature of breast cancer biology. Previous studies in this area mostly include the established prognostic and predictive factors, however, the most important for metastatizing appear differences in expression of less known proteins.

Materials and methods: Immunohistochemical assessment of GCDFP-15 protein expression and potential heterogeneity of primary tumors and metastases in axillary lymph nodes in breast cancer.

Results: The variation in GCDFP-15 expression within primary and metastatic breast cancer foci was revealed, as well as positive correlations between GCDFP-15 expression

and the presence of Ki-67 and the strength of expression of progesterone receptors in metastases.

Conclusions: The heterogeneity of metastatic breast cancer foci includes the expression of GCDFP-15. The revealed correlations between the expression of this protein and the established prognostic factors support the evaluation of lymph nodes involved in the course of cancer as a valuable complement to the primary tumor assessment. The role of GCDFP-15 protein in metastasizing in breast cancer requires further research with particular emphasis on the mechanisms of immune response.

Key words: breast cancer, GCDFP-15 protein, metastatizing, immunological system