

Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Wydział Lekarski I

Lek. Jeremi Kościński

**Analiza stężenia we krwi wybranych markerów molekularnych
u chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. dr hab. med. Roman Jankowski

Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2018 rok

Składam serdeczne podziękowania

Prof. dr hab. med. Romanowi Jankowskiemu - promotorowi pracy
za zaangażowanie, wsparcie naukowe i poświęcony czas.

Dr hab. med. Sławomirowi Michalakowi za umożliwienie
przeprowadzenia badań w Zakładzie Neurochemii i Neuropatologii
Katedry i Kliniki Neurologii UM w Poznaniu, cenne wskazówki
i uwagi.

Spis treści

1. Spis używanych skrótów	5
2. Wstęp	7
2.1. Wprowadzenie	7
2.2. Powstawanie przerzutów nowotworowych	10
2.2.1. Kaskada nowotworowa	10
2.2.2. Wybrane markery molekularne kaskady nowotworowej	14
2.2.2.1. Enzymy proteolityczne. Degradacja macierzy pozakomórkowej Metyloproteinazy MMP2, MMP9, uPA, tPA	14
2.2.2.2. Migracja i adhezja komórek. Receptor CD44 ó glikoproteina transbłonna	16
2.2.2.3. Angiogeneza, VEGF	17
2.2.2.4. Osteopontyna	18
2.3. Powstanie przerzutów nowotworowych w kręgosłupie	19
2.3.1. Patomechanizmy przerzutów nowotworowych do kręgosłupa	19
2.3.2. Powstawanie przerzutów w układzie kostnym	20
2.3.3. Patogeneza przerzutów osteolitycznych	23
2.3.4. Patogeneza przerzutów osteoblastycznych	25
3. Założenia i cele pracy	26
4. Materiał kliniczny i metodyka badań	27
4.1. Materiał kliniczny	27
4.1.1. Charakterystyka kliniczna Grupy I. Chorzy z przerzutami do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym.	28
4.1.2. Charakterystyka kliniczna podgrupy I.1. Przerzuty do kręgosłupa z raka nerki.	29
4.1.3. Charakterystyka kliniczna podgrupy I.2. Przerzuty do kręgosłupa z raka piersi.	30
4.1.4. Charakterystyka kliniczna podgrupy I.3. Przerzuty do kręgosłupa z raka prostaty.	30
4.1.5. Charakterystyka kliniczna podgrupy I.4. Przerzuty do kręgosłupa z innych narządów.	31
4.1.6. Charakterystyka kliniczna Grupy II. Grupa kontrolna. Chorzy ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym, przed jego operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa.	32
4.1.7. Charakterystyka kliniczna podgrupy II.1 z nowotworu nerki	32
4.1.8. Charakterystyka kliniczna podgrupy II.2 z nowotworu piersi	32
4.1.9. Charakterystyka kliniczna podgrupy II.3 z nowotworu prostaty	32
4.2. Metodyka badań	33

5. Wynik i badania	39
5.1. Porównanie wartości wskaźników kaskady nowotworowej i osteoklastogenezy nowotworowej w poszczególnych grupach badawczych z grup kontrolnych	39
5.1.1. Grupa I, wszyscy analizowani pacjenci, z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym nowotworu	39
5.1.2. Podgrupa I.1. Chorzy na raka nerki z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa	40
5.1.3. Podgrupa I.2. Chore na raka piersi z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa	41
5.1.4. Grupa I.3. Chorzy na raka prostaty z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa	42
5.2. Wartości wskaźników kaskady nowotworowej i osteoklastogenezy nowotworowej w poszczególnych grupach badawczych w odniesieniu do danych klinicznych i zastosowanego leczenia	44
5.2.1. Grupa I, wszyscy analizowani pacjenci, z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym nowotworu	44
5.2.2. Podgrupa I.1. Chorzy na raka nerki z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa	51
5.2.3. Podgrupa I.2. Chore na raka piersi z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa	57
5.2.4. Grupa I.3. Chorzy na raka prostaty z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa	64
6. Podsumowanie wyników	70
6.1. Porównanie aktywności wskaźników kaskady nowotworowej	71
6.2. Porównanie aktywności wskaźników kaskady osteoklastogenezy	75
7. Dyskusja	79
8. Wnioski	91
9. Piśmiennictwo	92
10. Streszczenie	103
11. Summary	105
12. Załączniki	107
12.1. Informacja o badaniu	1077
12.2. Zgoda chorego na badanie	1088
12.3. Zgoda Komisji Bioetycznej	10909
12.4. Wykaz rycin cytowanych w rozdziale 5. Wyniki badań	1100

1. Spis używanych skrótów

AFP ó alfa fetoproteina

ALPD ó fosfataza zasadowa

BMP ó białka morfogenetyczne kości

BSP ó sialoproteina kości

CAMs ó cz. steczki adhezyjne

CD44 ó glikoproteina transbłonowa

CEA ó antygen karcinoembrionalny

ECM ó białko macierzy zewn. trzkomórkowej

EMT ó przejście epitelialno mezenchymalne

ET-1 ó endotelina 1

FGFs ó metaboliczne czynniki wzrostu fibroblastów

GM-CSF ó czynnik stymulujący kolonie granulocytów

HIF-1a ó czynnik indukowany hipoksją

HMDP-Tc99m ó badanie scyntygraficzne kości z wykorzystaniem izotopu technetu

ICAM-1 ó mi. dzikomórkowa cz. steczka adhezyjna 1

IGFs ó insulinopodobny czynnik wzrostu

IL 1-6-8-11 ó interleukiny 1-6-8-11

ISE ó elektrolity jonoselektywne

MAPK ó kinazy aktywowane mitogenami

M-CSF ó czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów

MET ó przejście mezenchymalno epitelialne

MMP2 ó metaloproteinaza macierzy zewn. trzkomórkowej typu 2

MMP9 ó metaloproteinaza macierzy zewn. trzkomórkowej typu 9

MR ó badanie rezonansu magnetycznego

mRNA ó matrycowy RNA

N-CAM ó cz. steczka adhezyjna komórek nerwowych

OPG ó osteoprotegryna

OPN ó ostopontyna

PAI-1 ó inhibitor aktywatora plazminogenu typ 1

PAI-2 ó inhibitor aktywatora plazminogenu typ 2

PAP ó sterczowa fosfataza zasadowa

PAS ó system aktywacji plazminogenu
PDGF ó peptkopochnodny czynnik wzrostu
PECAM-1 ó cz steczka adhezyjna komórek ródbónka póttek krwi 1
PET ó badanie pozytronowej tomografii komputerowej
PgE2 ó prostaglandyny E2
PSA ó swoisty antygen sterczowy
PTHrP ó biaóko zwi zane z parathormonem
RANK ó aktywator receptora czynnika j drowego B
RANKL ó ligand aktywatora receptora j drowego czynnika B
rhVEGFR ó rekombinat ludzkiego ródbónkowego czynnika wzrostu
RNS ó reaktywne formy azotu
ROS ó reaktywne formy tlenu
rS ó wspóóczynnik korelacji Spearmana
SCA Ag ó antygen raka pónskónabónkowego
SCID ó ci óki zónony brak odporno ci
SHBG ó globulina wi óca hormony póciowe
TGF ó transformuj cy czynnik wzrostu alfa
TGF ó transformuj cy czynnik wzrostu beta
TIMP ó tkankowy inhibitor metyloproteinazy
TNF ó czynnik martwicy guza
TK ó badanie tomografii komputerowej
tPA ó tkankowy aktywator plazminogenu
uPA ó urokinazowy aktywator plazminogenu
uPAR ó receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu
VAS ó wzrokowa analogowa skala bólu
VEGF ó ródbónkowy czynnik wzrostu
VEGFR ó receptor ródbónkowego czynnika wzrostu
VPF ó naczyniowy czynnik przepuszczalno ci

2. Wstęp

2.1. Wprowadzenie

Zdolność komórek nowotworowych do rozsiewu z pierwotnego ogniska jest nieodłączną cechą nowotworów i główną przyczyną niepowodzenia w leczeniu. Nowotwór złośliwy jest tkanką nieprawidłową lub ich zbiorem wywodzącym się z prawidłowych tkanek organizmu cechujący się szybkim wzrostem (poprzez ciągłe i szybsze od normalnej proliferacji komórek), niekontrolowany wzrost komórek utrzymuje się pomimo braku działania czynnika inicjującego ten wzrost. Przerzuty wskazują zarówno na proces rozprzestrzeniania raka jak i powstanie ogniska wtórnego, czyli przerzutowego [87]. Słowo „metastasis” oznacza w języku greckim „przemieszczenie”, z przedrostkiem „meta” rozumianym jako „obok”, a „stasis” tłumaczone zwykle jako „zastój” oznacza „umiejscowienie”. Zatem przerzut definiujemy jako wzrost, oddzielny od pierwotnego guza, powstający z przeniesienia jego jednorodnych fragmentów [70]. Rozsiew nowotworu w drodze przerzutów odpowiada za więcej niż 90% śmiertelności w chorobie nowotworowej.

Właściwie skomplikowanych etapów, określanych kaskadą przerzutu „metastatic cascade” poprzedza rozsiew nowotworu złośliwego [42]. Nie wszystkie czynniki i mechanizmy kierujące tym procesem zostały zidentyfikowane, ale znamy wiele czynników wzrostu cytokin, mediatorów immunologicznych, szlaków molekularnych, które w nim uczestniczą [102, 71]. Kaskadę przerzutów obserwujemy w warunkach klinicznych i do wiadczaalnych [107]. Sekwencja wydarzeń obejmuje odłączenie komórki od guza, wejście do naczynia krwionośnego lub limfatycznego, jej transport, wyjście z naczynia, kolonizację, angiogenezę i limfangiogenezę [95].

Etapy te są ze sobą powiązane i uszkodzenie jednego z nich lub jego niewydolność przerywa ten proces [42]. Wynik tego procesu jest zależny zarówno od wewnętrznych właściwości komórek nowotworu, jak i reakcji organizmu, co oznacza jego różnorodność u różnych pacjentów. Przerzuty występują, gdy niestabilne genetycznie komórki nowotworu dostosowują się do mikrośrodowiska oddalonego od ogniska pierwotnego. Proces ten obejmuje zarówno wybór cech, które są korzystne dla komórek rakowych jak i jednocześnie tworzenie odpowiednich znaków środowiska z reguły przystosowanych do inwazji komórek nowotworu [56]. Zasady i etapy niezbędne dla tworzenia przerzutów są identyczne dla wszystkich nowotworów.

W chorobie nowotworowej u 2/3 chorych rozwijają się przerzuty do układu kostnego. Przerzuty w układzie kostnym mogą występować gdziekolwiek, najczęściej jednak są diagnozowane w części osiowej szkieletu kostnego. Nowotwory z pierwotnej piersi, prostaty, pęcherza moczowego i jajnika stanowią 80% wszystkich przerzutów do kości, wśród których najczęstszym jest kręgosłup, a rzadsze są przerzuty kostne raka nerki oraz tarczycy [49, 152].

Częstość występowania przerzutów, stwierdzanych w badaniach sekcyjnych do szkieletu kostnego jest następująca: 73% (zakres od 47% do 85%) w raku piersi, 68% (zakres od 33% do 85%) w raku gruczołowym, 42% (zakres od 28% do 60%) w raku tarczycy, 36% (zakres od 30% do 55%) w raku pęcherza, 35% (zakres od 33% do 40%) w raku nerki, 6% (zakres od 5% do 7%) w raku przewodniczącym, 5% (zakres od 3% do 11%) w nowotworach przewodu pokarmowego, 11% (zakres od 8% do 13%) w raku odbytnicy [26]. Mimo, że przerzut do kręgosłupa jest wyrazem znacznego zaawansowania procesu nowotworowego, ogniska pierwotnego nowotworu nie można określić w 9% wszystkich przypadków przerzutów do kręgosłupa [136].

Najczęściej przerzuty do kręgosłupa występują w odcinku piersiowym, chociaż inne badania wskazują na odcinek lędźwiowy. W odcinku szyjnym kręgosłupa przerzuty stwierdzane są u 10% chorych. Wielomiejscowe przerzuty do kręgosłupa występują u więcej niż 50% chorych. Przerzuty raka pęcherza i piersi zazwyczaj obecne są w odcinku piersiowym kręgosłupa. Przerzuty z raka prostaty wykazują predylekcję do odcinka lędźwiowo-krzyżowego. Nowotwory odbytnicy i odbytnicy zwykle dają przerzuty drogą wrotnej do wrotki i pęcherza, a dopiero w późnym stadium choroby do kości. Rak prostaty daje przerzuty typu osteosklerotycznego, rak piersi i chłoniaki o typie osteosklerotycznego i osteolitycznego, natomiast pozostałe nowotwory zazwyczaj typu osteolitycznego [3, 14, 63].

Ból jest najczęstszym objawem przerzutu nowotworowego do kręgosłupa. Przerzut niszczy kręgi lub kręgi i powoduje zmiany patologiczne, niestabilność kręgosłupa oraz ubytkowe objawy neurologiczne (niedowładność, porażenie kończyn, zaburzenia czynności zwieraczy pęcherza i odbytu). 36% przerzutów do kręgosłupa występuje bezobjawowo i są one rozpoznawane przypadkowo. Przerzut w odcinku piersiowym kręgosłupa najczęściej współwystępuje z ubytkowymi objawami neurologicznymi [126]. Stwierdzenie przerzutów w przebiegu choroby nowotworowej pogarsza rokowanie. Dane statystyczne podają informacje dotyczące okresu pięcioletniego przeżycia chorych z nowotworem prostaty (100%), nowotworem tarczycy (97%), nowotworem piersi (89%), nowotworem nerki (66%), nowotworem pęcherza (16%). Natomiast u chorych, u których stwierdzono obecność przerzutów w innych narządach okres pięcioletniego przeżycia byłby krótszy i wynosiłby 56%

u chorych z nowotworem tarczycy, 33% ó prostaty, 26% ó piersi, 10% ó nerki i 2% ó pę [2]. Nadal nie ma rodków terapeutycznych, które mogłyby zapobiega powstawaniu przerzutów nowotworowych do kr gosępa i innych cz ci szkieletu kostnego. W przypadkach przerzutów nowotworowych do innych narz dów nie mo na uzyska wyleczenia chorego, ale mo na d y do ograniczenia, zwolnienia lub zatrzymania choroby nowotworowej. Celem terapii jest przedę enie ycia i poprawienie jego jako ci.

W przypadkach wyst pienia przerzutów do kr gosępa operacja neurochirurgiczna ma charakter paliatywny, przedę a ycie od kilku do kilkunastu miesi cy. Wskazaniem do interwencji chirurgicznej s bóle, ubytkowe objawy neurologiczne, zniszczenie struktur kostnych kr gosępa, niestabilno ci, konieczno uzyskania materiału diagnostycznego (otwarta biopsja), brak reakcji nowotworu na radioterapi i nasilenie ubytkowych objawów neurologicznych podczas prowadzenia radioterapii [16].

W post powaniu leczniczym metod z wyboru jest chirurgiczne, doszcz tne usuni cie nowotworu, w miar mo liwo ci do granicy zdrowych tkanek, uwolnienie z ucisku rdzenia kr gowego, korzeni nerwów rdzeniowych, naczy krwiono nych. Powodzenie leczenia operacyjnego zale y od natury histologicznej nowotworu, zaawansowania choroby nowotworowej, ci ko ci uszkodzenia rdzenia kr gowego i stanu ogólnego chorego. Radykalne usuni cie nowotworu ogranicza wiele czynników, do których nale : zę ona budowa anatomiczna kr gosępa, bezpo rednie s siedztwo wa nych narz dów szyi, jam klatki piersiowej, brzucha i inne [14, 54].

Radioterapia jest uzupe eniem leczenia operacyjnego lub jest zalecana, gdy zabieg ograniczyęsi do biopsji nowotworu. Radioterapia wywiera zarówno wpęw leczniczy jak i przeciwbólowy. W przypadku 80% chorych z przerzutami do ko ci dochodzi pod wpęwem radioterapii do zmniejszenia dolegliwo ci bólowych, za u 50% ó z nich ból ust puje całkowicie [113]. Zmiany wielogniskowe w ko ciach mog by wskazaniem do zastosowania izotopu radioaktywnego strontu ($^{89}\text{SrCl}_2$), który działa leczniczo i objawowo (przeciwbólowo). Post powanie lecznicze obejmuje równie chemioterapi i hormonaln terapi zastępcz [120].

Od wielu lat trwaj poszukiwania specyficznych, osoczowych markerów dla choroby nowotworowej, przydatnych w diagnostyce, ocenie stopnia zaawansowania choroby, monitorowania skuteczno ci leczenia oraz prognozowaniu. Poznanie mechanizmów molekularnych w procesach prowadz cych do powstania przerzutów mo e wskaza špunktyö, w których mo liwa jest šblokadaö patologicznego procesu, a w przyszł ci mo e to przyczyni si do zwi kszenia skuteczno ci leczenia poprzez zastosowanie leków

skierowanych wybiórczo w stosunku do czynników odpowiedzialnych za inwazyjność nowotworów, oraz do wprowadzenia nowych schematów terapeutycznych.

Dotychczas nie były analizowane zagadnienia związane z chorobami nowotworowymi u chorych z obecnością przerzutów do kręgosłupa. W niniejszej rozprawie zostaną przedstawione wyniki analizy poziomu stężenia we krwi wybranych markerów biochemicznych, u chorych z obecnością przerzutów nowotworowych w kręgosłupie.

2.2. Powstawanie przerzutów nowotworowych

2.2.1. Kaskada nowotworowa

Nowotwór złośliwy cechuje dynamiczne zmiany genomu. Znaczna ilość nieprawidłowości strukturalnych obecnych w genomie złośliwego nowotworu powoduje niestabilność genomu o charakterze przejściowym bądź ciągłym, co powoduje wzrost zakresu spontanicznych mutacji prowadzących do zmian w ilości chromosomów (aneuploidia). Zatem niestabilność genomu leży u podstaw tumorigenezy, ewolucji nowotworu i jego różnorodności [105, 17].

W tym wydarzeniem dla zrozumienia powstawania przerzutów był postępowanie w interpretacji ewolucji gatunków, a co za tym idzie nowotworów [128]. Gdy nowotwór złośliwy ewoluuje, zmienia się jego zdolność do tworzenia przerzutów i naciekania okolicznych tkanek. Nowotwór zamiast stopniowo gromadzić małe mutacje, dramatycznie przekształca swój genom tworząc tzw. makromutacje. Pozwala to komórce stać się zabójcą. Ideę makromutacji wprowadził w 1940 r. biolog Richard Goldschmidt dowodząc, że organizmy tworzą nowe gatunki wtedy, gdy wielka ilość mutacji występuje w pojedynczym pokoleniu tworząc organizm, który nazwał "hopeful monster" [128]. Jego idea została początkowo odrzucona, ale proces ten zauważono u roślin i zwierząt. W raku proces ów ewoluuje analogicznie, wahać się od nowotworu łagodnego do złośliwego z obecnością przerzutów, zupełnie jak "hopeful monster" Goldschmidta. Od dziesięciu lat wiemy, że istnieje związek pomiędzy nowotworem złośliwym a niestabilnymi chromosomami, skłonnymi do wielkich mutacji z przekształcaniem chromosomów tworzących agresywne zachowania, jak tworzenie przerzutów [87].

Przed 125 laty Stephen Paget -1889 wyraził wątpliwość czy dystrybucja przerzutów nowotworów człowieka jest dziełem przypadku. Koncepcja anaplazji jest niczym innym niż przegrupowaniem (umschichtung) formalnych zmian tkankowych, co zmienia ich istotę. Hansemann był pierwszym, który jasno ustanowił brak ich udziału we wzajemnych relacjach (altruizm) tkanek i nasilenie ich niezależnie wywołano, traktując anaplazję jako brak

zró nicowania komórek [75].

Przećm stanowić wspomniana praca Pageta dotycząca problemu pochodzenia i istoty dystrybucji wtórnego wzrostu w raku piersi, z prób odpowiedzi na pytanie: „Co decyduje, czy narząd uciepni w przypadku rozsiańego raka?” Paget analizował protokoły sekcyjne 735 kobiet z nieuchronnie śmiertelnym rakiem piersi i uderzył o fakt rozbieżności pomiędzy zaopatrzeniem w krew a czystości przerzutów raka do danego narządu. Zauważył on szczególnie wysoki czystość przerzutów w wątrobie, jajniku i szczególnych kościach, a niską ich ilość w ledzionie. Zauważył także, że ta dysproporcja byłaby mniej wyraźna w przypadku czerniaka niż w raku piersi czy macicy.

Te spostrzeżenia były w sprzeczności z teorią Virchowa, według której przerzuty mogą wynikać z migracją komórek nowotworu powodującymi zatory w naczyniach krwionośnych. Paget wnioskował, że śodleg narządy nie mogą być bierne lub obojętne w stosunku do takich zatorów. Przyjmując zasadę „seed and soil” stwierdził: „Kiedy roślina wydaje ziarna, to siewne przenoszone we wszystkich kierunkach, ale tylko i wzrastają tylko na odpowiedniej glebie”. Swoją pracę zakończył cym stwierdzeniem: „Rozumowanie na podstawie statystyk jest skłonne do popełniania wielu błędów”. Jednak analogia z innymi rakami potwierdza jego sugestię, tzn. zależność między ziarnem a glebą. Istotnym dokonaniem Pageta był spostrzeżenie, że proces przerzutu nie był dziełem przypadku, ale raczej tego, że niektóre komórki nowotworowe („seed” ó ziarno) mają szczególne powinowactwo do środowiska niektórych narządów („soil” ó gleba), i że przerzuty występują tylko wtedy, gdy nasiona i gleba są ze sobą zgodne.

Obecnie przyjmowana hipoteza „ziarna i gleby” składa się z trzech części. Po pierwsze, nowotwory biologicznie niejednorodne, zawierają subpopulacje komórek o różnej angiogenezie, inwazyjności i właściwościach przerzutowych [43]. Po drugie, proces powstawania przerzutów jest typowy dla komórek, które sprzyjają inwazyjności, umożliwiają przetrwanie w kręgu krwi, zatrzymanie w odległych kapilarach narządu docelowego z wynajynieniem do środowiska i rozmnażaniem w obrębie danego narządu oraz angiogenezie.

Zatem przerzuty mogą powstawać z proliferacji pojedynczych komórek. Ostatecznie, wynik przerzutów zależy od wielu interakcji (cross-talk) między komórkami przerzutowymi a mechanizmami homeostatycznymi, nad którymi komórki przerzutowe mogą przejąć kontrolę. Indukcja angiogenezy jest dobrym przykładem tego procesu.

Współczesna hipoteza Pageta „seed and soil” jest powszechnie uznana i cytowana [59]. Obecne rozumienie „siewa i nasienie” zostało zmienione na komórki progenitorowe, komórki

inicjacyjne lub komórki macierzyste raka, wzgl. dnie przerzuty komórek, a „śleba” jest rozumiana jako zbiór lub mikro-rodowisko narządu lub narządów. Niezależnie od terminologii, nikt współcześnie nie kwestionuje poglądu, że wynik przerzutów zależy od cross-talk między komórkami guza a tkankami recepcyjnymi [41].

Zjawisko związane z powstawaniem przerzutów nowotworowych (metastatic cascade) jest procesem złożonym, wieloetapowym, wykazuje ścisły związek komórek nowotworowych z ich zdolnością do aktywności proteolitycznej, degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, migracji, aktywności proliferacyjnej w miejscu zasiedlenia oraz zdolnością do angiogenezy. Do powstania przerzutu komórki nowotworowe uwolnione z guza pierwotnego muszą dokonać inwazji otaczających tkanek: przekroczyć bariery podstawną (stanowi podstawę tkanki nabłonkowej, tę otacza warstwa komórek różnicowania naczy krwionośnych zaopatrujących guz), wnikać do naczy chłonnych i/lub krwionośnych (intravasation), następnie migrować przez ściany naczy do otaczających tkanek (extravasation), gdzie osiedlają się, proliferują, indukują angiogenezę i tworzą ognisko przerzutowe [110, 151].

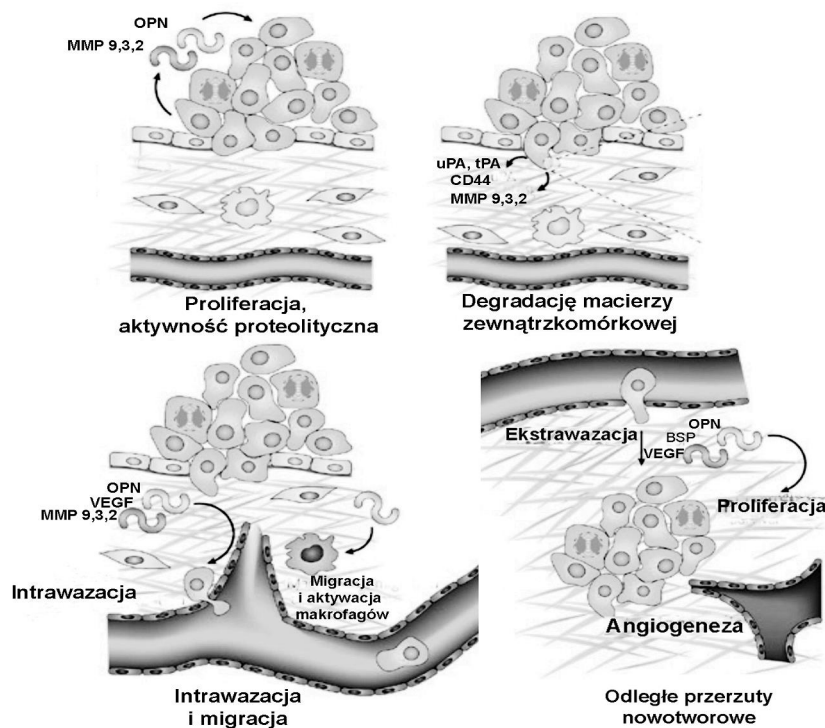
W zdrowych tkankach, składniki ich strukturalnej bariery przed powstawaniem nowotworu, jednak obecność transformowanych komórek nowotworowych inicjuje istotne zmiany dla konwersji tego środowiska w takie, które wspiera rozwój nowotworu. Zdolność komórek nowotworowych do degradowania składników macierzy pozakomórkowej ECM (extracellular matrix), bariery podstawnej i otaczającej tkanki pod cieliska guza rozpoczyna kaskad zjawisk związanych z powstawaniem przerzutów nowotworowych [134, 62].

Wydzielanie enzymów proteolitycznych-metaloproteinaz macierzowych oraz aktywatorów plazminogenu powoduje, że komórki nowotworowe są zdolne do trawienia tkanek, przekraczania bariery podstawnej i do przenikania przez ściany naczy krwionośnych i limfatycznych. Głównymi składnikami macierzy pozakomórkowej (kolagen, fibronektyna, laminina) pełni ważną, aktywną rolę w migracji i adhezji komórek.

Komórkowe czynniki powierzchniowe-integriny są ważnymi czynnikami funkcjonowania zarówno prawidłowych komórek różnicowania, jak i w zmianach towarzyszących progresji nowotworów w postaci inwazyjnej. Inną grupą komórkowych czynników powierzchniowych stanowi kadherine. Kadherine nie tylko spajają komórki nowotworowe, ale biorą też udział w proliferacji, różnicowaniu i śmierci komórek. Zmiany ekspresji i regulacji tych cząsteczek mają ścisły związek z inwazyjnością nowotworów. Utrata kontaktu i oderwanie się komórek od guza pierwotnego jest następstwem zaburzeń ekspresji powierzchniowych cząsteczek adhezyjnych [62, 48].

Kolejnym etapem kaskady przerzutowej jest migracja komórek nowotworowych na drodze ścieżki, która obejmuje utworzenie ogniskowego kontaktu adhezyjnego, tworzenie inwadopodiów oraz degradację białek podstawnej i macierzy pozakomórkowej. Następnie komórki nowotworowe w krwiobiegu lub w układzie limfatycznym. Komórki nowotworu, które utrzymują się w kręgowym zostają zatrzymane w mikronaczyniach narządowych umożliwiając początek inwazji. Cienkościenne naczynia limfatyczne stanowi niewielką barierę dla ścieżki komórek guza umożliwiając ich dalsze rozprzestrzenienie. Jest to charakterystyczne dla różnych raków, rozprzestrzeniających się przez naczynia limfatyczne w odróżnieniu od np. czerniaka rozprzestrzeniającego się hematogenie. Proliferacja komórek w narządzie dopełnia proces przerzutu. Aby przerzut mógł się rozwijać musi pojawić się neoangiogeneza, a także musi uniknąć odporności gospodarza [18, 124]. Guz awaskularny (poniżej 2 mm³) zaopatrywany jest w tlen i odżywiany za pośrednictwem dyfuzji. Rozległe unaczynienie przez naczynia krwionośne następuje, gdy guz osiągnie średnicę 2 mm [46].

W miarę progresji guza, hipoksja indukuje czynnik transkrypcyjny HIF-1a (hypoxia inducible factor), który promuje transkrypcję wielu genów ułatwiających przetrwanie komórek w warunkach hipoksji, a także genów czynnika wzrostu róbki naczy (vascular endothelial growth factor ó VEGF). Synteza i wydzielanie czynników angiogennych są istotne dla wytworzenia nowych naczy w tkankach gospodarza. Czynniki te stymulują migrację komórek róbki naczy w kierunku guza, ich proliferację i formowanie nowych naczy krwionośnych. Miejscowo inwazji tkanek zrębu dokonują komórki guza poprzez różne niewykluczające się mechanizmy [9, 157].



Rycina 1. Kaskada przerzutu nowotworowego. Modyfikacja wg Bellahcene A. i wsp. 2008 [6].

2.2.2. Wybrane markery molekularne kaskady nowotworowej

2.2.2.1. Enzymy proteolityczne. Degradacja macierzy pozakomórkowej Metyloproteinazy MMP2, MMP9, uPA, tPA

W procesach wejścia i/lub wyjścia z naczynia krwionośnego lub limfatycznego (intra- i ekstrawazacji) komórki nowotworowe muszą pokonać bariery podstawną, otaczającą warstwę różnicowania naczyń. Proces ten wymaga aktywacji enzymów proteolitycznych: metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinases, MMPs), zależnych od cynku, zwanych matryksynami i proteinaz serynowych, między innymi ukladu plazminogenu [93]. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej wytwarzane są zarówno przez komórki nowotworu, jak i komórki podścieliska. Zaliczane są do grupy enzymów proteolitycznych, które uczestniczą w fizjologicznych i patologicznych procesach przebudowy tkanek (remodelingu). MMPs mają zdolność niszczenia bariery podstawnej i składników macierzy zewnątrzkomórkowej oraz degradacji czynników wzrostu oraz receptorów na powierzchni komórek guza (wpływ na migrację komórek nowotworowych). Modulują one przebieg procesu nowotworzenia (prolifерacja komórek nowotworowych), apoptozy i angiogenezy [131, 34].

Metaloproteinazy mają zróżnicowane spektrum działania, ich profil ekspresji zmienia się wraz z progresją nowotworu. Zdolne do rozkładu elastyny i kolagenu są metaloproteinaza 2 (MMP2), zwana elastynazą A i metaloproteinaza 9 (MMP9). Aktywność proteolityczna MMP może być regulowana przez tkankowe inhibitory metaloproteinaz (tissue inhibitors of metalloproteinases – TIMP). TIMP nie tylko oddziałują hamująco w procesie tworzenia przerzutu nowotworu, ale mogą działać także jako cytokiny i czynniki wzrostowe stymulując proliferację komórek. Aktywność metaloproteinaz zależy od równowagi między nimi i ich inhibitorami tkankowymi [151].

Proteazy serynowe biorą udział w degradacji macierzy pozakomórkowej, są enzymami proteolitycznymi, z których najważniejszą jest plazmina. Plazmina powstaje w wyniku aktywacji jej prekursora, plazminogenu, dzięki działaniu systemu aktywatora plazminogenu (plasminogen activation system – PAS). Układ aktywatora plazminogenu zawiera dwie proteiny serynowe, tj. urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA) i tkankowy aktywator plazminogenu (tPA), receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPAR) i dwa inhibitory, PAI-1 i -2 [151].

Układ fibrynolityczny wewnątrz naczyń krwionośnych zapewnia usuwanie zbędnej fibryny i utrzymanie płynności krwi, a pozanacyniowa aktywność układu białek fibrynolizy ograniczona jest do migracji komórek i przebudowy tkanek. Białka fibrynolizy odgrywają rolę w progresji i powstaniu przerzutów nowotworowych (degradacja białek bony podstawnej i macierzy zewnątrzkomórkowej, niszczenie połączeń międzykomórkowych oraz połączeń typu komórka-macierz). Urokinazowy aktywator plazminogenu i jego receptor w progresji nowotworów oddziałują bezpośrednio (zdolność proteolityczna plazminy) i pośrednio (aktywność mitogenna i prozapalna, udział w szlakach przekazywania sygnału). uPA jest syntetyzowany przez komórki rdzenia kręgowego, komórki mięśni gładkich, komórki nabłonkowe, fibroblasty, monocyty/makrofagi. Proces proteolizy pozanacyniowej z udziałem plazminy polega na aktywacji plazminogenu przez urokinazowy aktywator plazminogenu (uPA, urokinase-type plasminogen activator) zwany także urokinazą, połączony ze swoistym receptorem (uPAR, urokinase-type plasminogen activator, inaczej receptor CD87 (cluster of differentiation 87) znajdującym się na powierzchni komórek [139, 73].

Do substratów plazminy poza fibrynogenem i fibryną należą białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, extracellular matrix), białka bony podstawnej (lamina, fibronektyna, witronektyna, trombospondyna, proteoglikany i inne), czynniki wzrostu

(zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, transformujący czynnik wzrostu proenzymy (np. zymogeny metaloproteinaz) [73].

2.2.2.2. Migracja i adhezja komórek. Receptor CD44 ó glikoproteina transbónowa

Cz steczki adhezyjne, adhezyny (cell adhesion molecules ó CAMs) s białkami receptorowymi, glikoproteinami, stanowi c integraln cz białek bón komórkowych i pełni wa n funkcj w migracji komórek. Po rednicz one w odbiorze informacji ze rodowiska zewn trznego, przeksztaćeniu jej, a nast pnie przekazywaniu w formie sygnać do poszczególnych struktur komórkowych. No nikami sygnać s zwykle substancje sygnaćwe, które po poćczeniu ze swoistym ligandem na danej komórce, wywoćj kaskad reakcji biochemicznych, zwanych przekazywaniem lub transdukcj sygnać [11].

W procesie nowotworowym obserwuje si zaburzenia adhezji, proliferacji komórkowej, a tak e zmniejszon integralno mi dzy komórkami i macierz mi dzykomórkow ./ a cuch aminokwasowy adhezyn skćda si z trzech odcinków: krótkiej domeny cytoplazmatycznej poćczonej z cytoszkieletem, fragmentu transbónowego i domeny zewn trzkomórkowej, odpowiedzialnej za wi zanie ligandu wraz z odbieraniem sygnaćw pochodz cych z otaczaj cego rodowiska oraz przekazywanie odpowiedzi na te sygnać. W ród cz steczek adhezyjnych wyró nia si : cz steczki immunoglobulinopodobne, kadheryny, integryny, selektyny oraz cz steczki CD44 [86].

Przyleganie komórek (adhezja) odgrywa zasadnicz rol w powstawaniu i rozsiewie nowotworu. Mo emy wyró ni trzy rodzaje adhezji: przyleganie cisć (tight junction), zakotwiczenie (anchoring junction), poćczenie mi dzy cytoplazmami dwóch komórek (communicating junction, gap junction). Nexus (gap junction) lub poćczenie komunikacyjne odgrywa gćwnie rol w rozsiewie nowotworu, a mniejsz w adhezji komórkowej. Cz steczki adhezyjne komórek, zazwyczaj czćnków rodziny kadheryn (kompleksy z katenin) i czćnków desmosomów, s niezb dne dla komórek nowotworowych, aby przylegać do siebie nawzajem i do kształćowania masy guza. Brak lub zaburzenie funkcji tych cz steczek prowadzi do wzrostu inwazyjno ci i ruchliwo ci komórek nowotworu [15, 64].

Komórki nowotworowe wykazuj pewne preferencje do osiedlania si w szczególnych narz dach. Odbywa si to prawdopodobnie dzi ki chemotaksji komórek nowotworowych w stosunku do cytokin wytwarzanych przez narz dy gospodarza, dzi ki sprzyjaj cym warunkom rodowiska w danym narz dzie lub te poprzez selektywn adhezj komórek

nowotworowych z komórkami ródka naczy w danym narz dzie. Nadekspresja niektórych integryn wskazuje, e integryny s gównymi molekuami uczestnicz cymi w tej selektywnej adhezji [38].

Receptor CD44 (Cluster of Differentiation) jest jedno cuchow glikoprotein transbnow (37 kDa) o charakterze kwasowym (obecno kwasu sialowego). Bia co zwi zane z bami komórkowymi jest gównym receptorem dla hialuronianu. Kilka innych cz steczek: kolagen, fibrynogen, fibronektyna, laminina, siarczan chondroityny €cz si z CD44. CD44 charakteryzuje si du zmienno ci strukturaln . Ró norodno budowy CD44 powoduje, e nie wszystkie komórki posiadaj ce ten receptor wi hialuronian [69, 94].

Hialuronian na skutek oddziaywania z CD44 bierze udzia w przywieraniu komórek do ECM, adhezji leukocytów do ródka naczyniowego, stymuluje procesy agregacji, proliferacji, migracji, a tak e angiogenezy [60].

Nadekspresja receptorów CD44 ma miejsce na powierzchni wielu komórek nowotworowych. W procesie onkogenezy zwi ksza si aktywno CD44 [53]. Pobudzenie receptorów CD44 przez hialuronian uruchamia liczne szlaki biochemiczne i przyczynia si do wzrostu, prze ywalno ci, migracji i inwazji komórek nowotworowych [10].

2.2.2.3. Angiogeneza, VEGF

Folkman w 1974 r. by pierwszym, który powi za unaczynienie nowotworu z jego wzrostem. Rozwojowi nowotworu zawsze towarzyszy neowaskularyzacja. Wzrost nowych kapilar jest bardziej energiczny i permanentny, ni obserwowany w przypadkach gojenia ran lub podczas odczynu zapalnego [47].

Ferrara i Henzel jako pierwsi, w 1989 r., wyizolowali i sklonowali czynnik wzrostu ródka naczyniowego (VEGF). By to dyfuzyjny mitogen specyficzny dla komórek ródka z komórek p cherzykowych przysadki wo i, który nazwali VEGF. Otrzymali go w procesie alternatywnego splicingu, czyli poprzez usuni cie intronów (sekwencji niekoduj cych) i po czenie eksonów (sekwencji koduj cych) z prekursorowego mRNA [44, 45]. Pocz tkowo nazwali go naczyniowym czynnikiem przepuszczalno ci (Vascular Permeability Factor VPF), a nast pnie czynnikiem wzrostu ródka naczyniowego (Vascular Endothelial Growth Factor VEGF), który jest wielofunkcyjn cytokin angiogenn spotykan w wielu nowotworach [12].

VEGF jest glikoprotein wi c si z proteoglikanami macierzy pozakomórkowej

i mitogenem oraz czynnikiem wzrostu komórek r6b6nka, powoduj cym jednocze nie wzrost przepuszczalno ci naczy . Znanych jest sze ro nych postaci VEGF, oznaczanych literami od A do F. Najbardziej poznana postaci jest VEGF-A, która wyst puje w czterech izoformach, VEGF-121, -165, -189 i -205. VEGF-121 i -165 wyst puj w postaci rozpuszczalnej, wydzielanej przez komórki, natomiast VEGF-189 i -205 s zwi zane z b6n kom6rkow . Czynniki te dzia 6j jako przekazniki sygna 6w poprzez zwi zanie z jednym z trzech receptor6w z rodziny kinazy tyrozynowej: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) i VEGFR-3 (Flk-4), obecnych na kom6rkach r6b6nka. VEGFR-1 aktywuje migracj i r6nicowanie kom6rek. VEGFR-2 aktywuje natomiast proliferacj i modyfikuje przepuszczalno naczy . VEGFR-1 i -2 ulegaj ekspresji g 6wnie w r6b6nku naczy krwiono nych [144]. Ekspresja VEGF wzrasta w nowotworach z 6liwych i jest zwi zana ze wzrostem mikrounaczynienia [104]. Wykazano te , e hipoksja indukuje wzmo one wytwarzanie VEGF przez komórki nowotworowe, a jego wi zanie z receptorami, które ulegaj ekspresji g 6wnie na kom6rkach r6b6nka powoduje wzrost przepuszczalno ci naczy i migracj tych kom6rek w kierunku guza, gdzie tworz now sie naczy krwiono nych [37]. VEGF indukuje przepuszczalno mikronaczy 50 000 razy silniej ni histamin, prowadz c do wynaczynienia bia 6k osocza. Nast pstwem tego s zmiany proangiogenne. VPF/VEGF jest tak e r6b6nkowym mitogenem wyzwalaj cym transdukcj sygna 6 zwi kszej c st enie bia 6k jak kolagenazy i aktywatory plazminogenu odgrywaj ce rol w angiogenezie [20, 29].

2.2.2.4. Osteopontyna

Osteopontyna (OPN) po raz pierwszy zosta 6 opisana przez Sengera i wsp. w 1979 r. jako potencjalny marker transformacji kom6rek nab6nkowych [122]. Przedrostek "osteo" wskazuje, e bia 6co to jest znajduwane w ko ciach, chocia obecne jest w innych tkankach. Przyrostek 6 "pontin" pochodzi od 6ci skiego s 6wa "pons", czyli most, co oznacza pe 6nienie roli w wi zaniu bia 6k. OPN w procesach fizjologicznych odgrywa rol w mineralizacji tkanki kostnej, syntezie bia 6ca, które powstaje w kom6rkach macierzy kostnej i umo liwia umiejscowienie w niej osteoklast6w. OPN odgrywa wa n rol w procesach zapalnych, gojeniu ran, resorpcji ko ci [89, 50].

Osteopontyna jest ufosforylowan glikoprotein , przynale n do rodziny cz steczek o charakterze chemokin zwi zanych z macierz zewn trzkom6rkow tzw. SIBLING (small integrin binding ligand N-linked glycoprotein). Charakterystyczn jej cech jest sekwencja Arg-Gly-Asp (RGD). Gen osteopontyny umiejscowiony jest na d 6gim ramieniu chromosomu

4 (4q21 ó 4q25) [40].

Osteopontyna wytwarzana jest przez liczne nowotwory. OPN bierze udział w rozwoju nowotworów i tworzeniu ognisk ich przerzutów poprzez adhezję komórek, chemotaksję, supresję interleukiny 10, zapobieganie apoptozie, wzmacnia wzrost komórek guza poprzez regulację interakcji komórka ó matrix i sygnalizację komórkową wi ą c si z integrynami i receptorami CD44 oraz tworzenie nowych naczy ń krwiono nych (angiogeneza) [114, 146].

Postać rozpuszczalna OPN, która jest między innymi wytwarzana przez komórki nowotworowe, jest cząsteczką przekazywaną i pobudza potencjał proliferacyjny komórek. Ligandami dla OPN na powierzchni komórek są izoformy cząsteczki CD44 oraz receptory integrynowe.

Obecna w centralnej części cząsteczki OPN trójpeptydowa sekwencja RGD, wysokoselektywna dla integryn, odgrywa podstawową rolę w interakcji z niektórymi integrynami. Osteopontyna oddziałuje wzajemnie z receptorami powierzchni komórki poprzez trójpeptydową sekwencję: arginina, glicyna, asparagina (ArgóGlyóAsp). Wykazano, że peptydy RGD (RGD peptides) mają znaczny potencjał do wiązania się z komponentami macierzy zewnątrzkomórkowej [78]. Pod wpływem trombiny dochodzi do proteolizy OPN, w wyniku której powstaje mniejsza cząsteczka trOPN, która jest biologicznie czynna i oddziałuje na komórki poprzez interakcję z integrynami $\alpha 1$ i $\beta 1$. Zjawisko to odpowiedzialne jest za indukcję migracji i inwazji komórek nowotworowych [156].

2.3. Powstanie przerzutów nowotworowych w kręgosłupie

2.3.1. Patomechanizmy przerzutów nowotworowych do kręgosłupa

Opisano różne sposoby przerzutu nowotworu, z kręgowego (raka) do szkieletu kostnego. Najczęściej jest to droga hematogenna. W kręgosłupie przerzuty powstają drogą naczyń krwionośnych żylnych, a inne kości (ramienna, udowa, miednica) nowotwór przekształca drogą kręgu kręgowego. Mniej często obserwuje się powstawanie przerzutu poprzez cięgno, a jeszcze rzadziej na drodze limfatycznej (która dotychczas nie do końca została poznana) [142].

W 1940 roku Batson w przeprowadzonych badaniach do wiadczałych wykazał, że po iniekcji kontrastu i komórek nowotworowych, u osobników płci męskiej do odbytnicy, a u żeńskich ó do odbytnicy, zarówno podany kontrast jak i komórki nowotworowe przemieszczają się do kręgosłupa jako wynik żylnego refluksu, który występuje w następstwie próby Valsalvy (wzrost ciśnienia wewnątrz klatki piersiowej i/lub jamie

brzuszej). W ten sposób istnieje możliwość rozszewienia raka piersi do kręgosłupa przez żyłę parzystą, chociaż się z przykrym przykładem splotami Batsona w okolicy piersiowej i raka prostaty, którego unaczynienie ściśle komunikuje się ze splotami żylnymi miednicy oraz splotami Batsona w okolicy lędźwiowej [4]. Ta hipoteza została potwierdzona w badaniach do wiadczałych przez Coman i DeLong, którzy zauważyli, że u 70% szczurów występowały przerzuty do kręgosłupa po podaniu do żył udowej komórek nowotworowych i wywołaniu wzrostu ciśnienia w jamie brzusznej. Żyłki splotu Batsona są żyłkami, które znajdują się w przestrzeni nadtwardówkowej, pomiędzy strukturami kostnymi kanału kręgowego a oponą twardą. Nie posiadają one zastawek, które kontrolują przepływ krwi. Wzrost ciśnienia w zakresie żył gębowej dolnej powoduje zwiększony przepływ krwi w splotach żylnych kanału kręgowego [27].

Komórki raka mogą dawać przerzuty drogą krwionośną do trzonów kręgowych bezpośrednio przez tętnice od dawno, np. w raku pęca. Arguello i wsp. wykazali, że wstrzyknięcie do tętnic różnych komórek nowotworu z kręgosłupa u myszy powoduje powstawanie przerzutów w trzonach kręgowych i objawy ucisku rdzenia kręgowego [3]. Innymi sposobami powstawania przerzutów w kręgosłupie jest bezpośrednio naciekanie raka prostaty odcinka lędźwiowego i raków piersi i pęca odcinka piersiowego kręgosłupa [142].

2.3.2. Powstawanie przerzutów w układzie kostnym

Powstanie przerzutu w kości jest złożonym procesem obejmującym transport komórki z pierwotnego ogniska do tkanki kostnej, zatrzymanie i rozwój komórki nowotworowej. Kaskada zachodzących zjawisk jest podobna do przerzutu nowotworu z jakiegokolwiek ogniska pierwotnego do innych narządów. Komórka nowotworowa musi wydostać się z pierwotnego ogniska, oddzielić się od innych komórek i zrębu poprzez redukcję oddziaływań molekularnych, otwarcie bariery podstawnej błony, migrację do krwioobiegu, ustrzec się nadzoru komórek immunologicznych, przedostać się do naczyń sinusoidalnych szpiku kostnego, tam się zatrzymać i rozwinąć [99].

W tym procesie główną rolę odgrywa aktywność proteinaz, takich jak metalloproteiny, seryna, cysteina i proteinaza asparaginowa, stromelizyna, urokinazowy aktywator plazminogenu. Te proteiny niszczą bariery podstawną błonki i otaczają tkankę poprzez degradację kolagenu typu IV, lamininy, proteoglikanów i innych białek. Również proteiny zmniejszają przyleganie komórki do komórki, poprzez ingerencję

z receptorami adhezji znajdującymi się w błonach komórkowych [32, 58, 129].

W interakcji nowotwór-gospodarz podlega szeregowi szeregu czynneczek adhezyjnych znajdujących się na powierzchni komórki, które należą do czterech super-rodzin (superfamilies) – integryn, kadheryn, immunoglobulin i selektyn. Nabycie właściwości inwazyjnych i dyfuzyjnych przez komórki nowotworowe jest związane ze zmianami w zakresie tych molekuł – szczególnie ze spadkiem ekspresji E-cadheryny i ze wzrostem powierzchniowej glikoproteiny CD44 [61].

Ekspresja molekuł adhezyjnych takich, jak integryny $\alpha 5 \beta 1$ i $\alpha 6 \beta 1$ lub PECAM-1, ICAM-1 i N-CAM odgrywa istotną rolę w interakcji komórek nowotworowych z ródkiem i macierzą zewnątrzkomórkową. Uprzywilejowanymi miejscami przerzutów do kości jest szkielet, które zawierają czerwony szpik kostny (trzon kręgosłupa, kość biodrowa, mostek, kość udowa, nasady kości długich). W tych miejscach szkieletu kostnego jest bogate unaczynienie i zmniejszona przepływność krwi, powstają zatory krwi i mikrokatary. Warunki te zapewniają przyczepność i unieruchomienie komórek nowotworowych przez komórki ródka [66, 149].

Inna teoria sugeruje, że komórki migrują i umiejscawiają się w korzystnych tkankach docelowych, tam, gdzie znajdują najbardziej podatny grunt (soil) do swojego rozwoju. Z uwagi na to, że kość i szpik kostny wykazują ekspresję różnych czynników wzrostu, cytokin, enzymów, substancji podobnych do hormonów (hormon-like substance), które wraz z podobnymi czynnikami produkowanymi przez komórki nowotworowe, może sprawić, że mikrośrodowisko kości (soil "gleba") nadaje się do implantacji komórek (seeding "zasiew") i ich rozwoju [99, 90, 52, 117].

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (matrix metalloproteinases, MMP), sialoproteina kości (Bone sialoprotein, BSP), osteopontyna odgrywają kluczowe role we wszczepieniu komórek nowotworowych do szpiku kostnego przez degradację macierzy zewnątrzkomórkowej, zmiany oddziaływania w relacjach komórka – komórka, komórka – macierz pozakomórkowa, interakcji w regulacji zwrotności i chemotaktycznej migracji komórek ródka oraz promowaniu angiogenezy [32, 7, 129, 39].

Po dotarciu komórek nowotworowych do szpiku kostnego, ich wzrost i rozwój ogniska przerzutowego zależy od licznych wspierających i hamujących czynników, przede wszystkim od interakcji z otaczającą kość i szpikiem kostnym, poprzez zwiększenie ekspresji czynneczek adhezyjnych, dostępności przestrzeni (availability of space), stopnia unaczynienia i rodzaju przebudowy (remodelling) kości. Osteoblasty wpływają na komórki szpiku powodując aktywację komórek macierzystych z następnym limfopojez. Rozwój

przerzutów w sposób oczywisty zależy od stopnia proliferacji komórek nowotworowych, ale i inne procesy są istotne w tym kontekście, głównie neoangiogeneza [72].

Tkanka kostna ulega ciągłemu procesowi resorpcji z uwagi na działanie osteoklastów i przebudowie przez działanie osteoblastów. Sygnały regulacyjne mogą pochodzić z daleka, jak kalcytonina i hormon przytarczyc, lub mogą być miejscowe w kości prowadzące do bezpośredniej modulacji różnicowania i aktywności komórek przebudowy kości [141].

W warunkach fizjologicznych proces jest zrównoważony. W przypadku wystąpienia przerzutu nowotworowego do kości następuje zaburzenie równowagi, przeważają procesy osteolityczne, osteoblastyczne lub mieszane. Za stymulację wzmożonej aktywności osteoklastów i zmniejszenie aktywności osteoblastów odpowiedzialne jest nie tylko oddziaływanie komórek nowotworowych. Zmiany osteoblastyczne są wyrazem wzrostu procesów tworzenia kości wokół komórek guza związanej z nierównowagą osteolitycznej aktywności i zmienionym środowiskiem kości. Po inwazji do kości, komórki nowotworowe, wytwarzają czynniki wzrostu, które stymulują bezpośrednio aktywność osteoklastów i/lub aktywność osteoblastów powodując przebudowę kości i dalsze uwalnianie czynników wzrostu. Prowadzi to na zasadzie śródniwego kości do destrukcji kości i wzrostu ogniska przerzutowego [158, 115, 79].

Istotnym dla powstawania przerzutów do kości jest receptor NF- κ B ligand (RANKL ó Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand), który jest ligandem aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B, czyli białka uczestniczącego w metabolizmie kości (aktywacja osteoklastów), należącego do rodziny czynników martwicy nowotworów. Badania genetyczne wykazały, że drogi sygnałowe Wnt (Wnt signaling pathway) oraz BMP (Bone morphogenetic proteins) mają znaczenie w onkogenezie wpływając na dyferencjację osteoblastów pochodzących ze szpikowych prekursorów mezenchymalnych. Natomiast osteoklasty wywodzą się od monocytarnych gałęzi hematopoezy ulegają różnicowaniu poprzez zwiększenie stężenia cytokin, takich jak M-CSF, RANKL, IL-6, IL-8, IL-11 [92].

Różnicowaniem wielu tych czynników, w tym RANKL, są osteoblasty ustanawiające cykle komórkowe i molekularnie istotne dla miejscowej homeostazy kości [90]. Komórki nowotworów złośliwych dających przerzuty do kości przejmują i wykorzystują mechanizmy fizjologiczne. Podczas gdy komórki raka prostaty często wytwarzają czynniki sprzyjające osteoblastom, w tym BMP, czynniki związane z rodziną sygnałów Wnt, endotelin-1, pochodnym czynnikiem wzrostu (PDGF ó Platelet-derived growth factor) regulującym różnicowanie i podział komórki, obecne w osteolitycznych komórkach raka gruczołowego, są przyczyną hamowania tych dróg. Dzieje się tak dzięki wytwarzaniu

rozpuszczalnych inhibitorów, czyli nadmiernemu wytwarzaniu czynników indukujących osteoklasty jak PTHrP (Parathyroid hormone-related protein), IL-8, and IL-11 [82].

Poza tym często dochodzi do przerwania pętli homeostaticznej RANK-RANKL pomiędzy osteoklastami a osteoblastami. Przerzuty raka wydzielają znaczne ilości RANKL inhibitora osteoprotegeryn, znanego także jako osteoclastogenesis inhibitory factor, tym samym osłabiając reakcję osteoklastów podczas przerzutu. OPG wiąże się do RANKL osteoblastów komórek zrębu blokuje interakcje RANKL-RANK pomiędzy osteoblastami komórek zrębu a osteoklastami [82], i odwrotnie, osteolityczne komórki raka wydzielają proteazy, które przeprowadzają RANKL w postaci bardziej aktywnej [111].

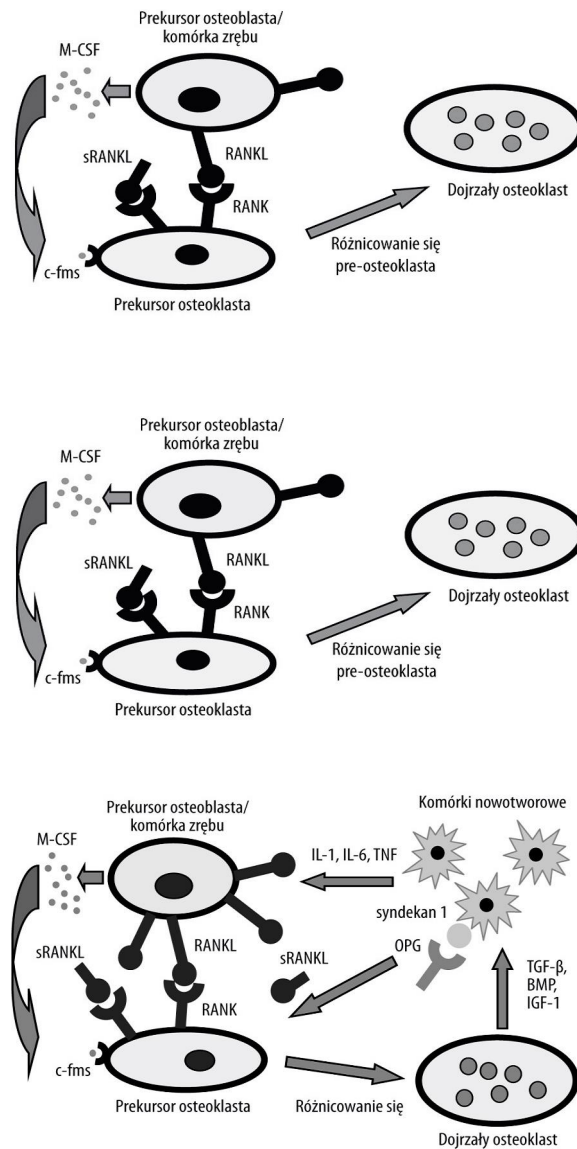
2.3.3. Patogeneza przerzutów osteolitycznych

Komórki nowotworowe wytwarzają interleukiny: (IL-1-6-8-11, prostaglandyny E2 i PgE2), transformujący czynnik wzrostu β (Transforming growth factor TGF β , TGF β), naskórkowy czynnik wzrostu (Epidermal growth factor EGF), naczyniowy czynnik wzrostu (VEGF), czynnik martwicy guza (TNF), czynnik stymulujący kolonie granulocytów (GM-CSF) i czynnik stymulujący kolonie monocytów (M-CSF), które w sposób pośredni lub bezpośrednio stymulują aktywność osteoklastów i w następstwie resorpcji [127, 115, 90].

Enzymy proteolityczne takie, jak kwasna fosfataza kwasna hydrolaza, zasadowa fosfataza, metalloproteinazy MMP2, MMP9 i K katepsyna uczestniczą we wczesnej fazie tworzenia się przerzutu w kości, powodują degenerację błony podstawnej, wspierają dyfuzję komórek nowotworowych i uwalnianie się cytokin macierzy komórkowej. Stymulują także proliferację komórek guza [96, 54]. Komórki nowotworowe mogą zwiększać resorpcję kości pobudzając związaną z nowotworem odpowiedź immunologiczną, której towarzyszy uwolnienie czynników aktywujących osteoklasty (osteoclastic activating factors) [116].

Biało związane z hormonem przytarczyc wytwarzane przez komórki raka piersi odgrywa kluczową rolę w resorpcji kości poprzez stymulację aktywności osteoklastów. Występuje w grupie 92% pacjentek z przerzutami, a w grupie bez obecności przerzutów do kości tylko w 50% przypadków [109]. PTHrP i IL 1-6-11 wywołują resorpcję kości przez stymulację osteoklastów i komórek zrębowych do wytwarzania aktywatora receptora czynnika jądrowego - B (Receptor activator of nuclear factor- B, RANK).

RANK wiąże się ze swoim receptorem w komórce prekursorowej osteoblastu powodując proliferację i różnicowanie osteoblastu (ryc.2) [116].



Rycina 2. Kaskada osteoclastogenezy nowotworowej. Modyfikacja wg Stanisławski M. i Kmiec Z. [130].

Uszkodzenie kości spowodowane tworzeniem się przerzutu nowotworowego ułatwia uwalnianie czynników wzrostu, takich jak TGF, IGFs, FGFs, PDGF, BMPs. Stymulują one proliferację komórek nowotworowych i wytwarzanie PTHrP, a w następstwie ósteoliz kości.

Osteolizie i uwalnianiu czynników wzrostu towarzyszy, na zasadzie błędnego koła, proliferacja i wzrost komórek nowotworowych. Wytwarzanie osteoprotegeryny, czyli czynnika hamującego osteoklasty przez osteoblasty, neutralizuje osteolizę blokując RANK ligand. Ponadto ekspresja IL-6 w komórkach raków prostaty i piersi stymuluje osteoklasty poprzez wzmocnienie efektu oddziaływania PTHrP na osteoklasty [127, 159].

2.3.4. Patogeneza przerzutów osteoblastycznych

Osteoblastyczne przerzuty do kości występują w raku prostaty. W komórkach raka prostaty została wykazana ekspresja czynników wzrostu: TGF β , PDGF, BMPs, IGFs, FGFs i uPA. Czynniki te stymulują różnicowanie osteoblastów, jak również wzrost i przetrwanie komórek nowotworowych [1, 158, 55, 54].

Podwyższony poziom endoteliny 1 (endothelin 1, ET-1) występuje u pacjentów z obecnością przerzutów raka prostaty, a nie jest obserwowany u chorych bez przerzutów. ET-1 stymuluje aktywność osteoblastyczną, a hamuje aktywność osteoklastyczną, zwiększa proliferację komórek raka, stymuluje inne czynniki wzrostu. Wytwarzanie ET-1 hamują androgeny. Antagoniści ET-1 powodują zmniejszenie zarówno wzrostu guza pierwotnego, jak i osteoblastycznych przerzutów do kości. PTHrP i jego receptor występują w pierwotnym ognisku raka prostaty i jego przerzutach do kości [22].

Komórki raka prostaty wykazują bezpośrednią ekspresję RANK ligand, który indukuje resorpcję kości, poprzez aktywność osteolityczną. Produkty degradacji kości zostały wykazane w moczu, co pozwala twierdzić, że na początku rak prostaty wykazuje aktywność osteolityczną, a następnie wysoką aktywność osteoblastyczną [24, 13]. W innych badaniach udowodniono, że wprowadzenie komórek guza PC-3 u myszy z ciężkim zdefiniowanym brakiem odporności (severe combined immunodeficiency SCID) spowodowało, że kości puszczeli, zmiany osteolityczne pod wpływem RANK ligand, podczas gdy inne linie komórkowe kierowały powstaniem zmian kościotwórczych. Badania te pozwalają stwierdzić, że osteoklastyczna aktywność nie jest konieczna do powstawania zmian osteoblastycznych [74].

Ponadto w raku prostaty szlak sygnalizacyjny Wnt indukuje aktywność osteoblastów, która we wczesnej fazie może być zrównoważona przez DKK1 (Dickkopf-related protein 1) i prowadzi do zmian osteolitycznych. W procesie progresji guza przerzutowego następuje zaburzenie równowagi pomiędzy Wnt i jego inhibitorami, występuje wówczas zmiany osteoblastyczne [81, 57]. Niemniej jednak indukowany przez nowotwór swoisty antygen sterczowy (Prostate-specific antygen, PSA) może blokować PTHrP [28], a następnie resorpcję kości i aktywować osteoblastyczne czynniki wzrostu, tak jak TGF β , IGF-1 uwalniane przez kość podczas powstawania ognisk przerzutowych, prowadząc na zasadzie błędnego koła do powstawania zmian osteoblastycznych [115].

3. Założenia i cele pracy

W przypadkach wystąpienia przerzutów do kręgosłupa operacja neurochirurgiczna ma charakter paliatywny, przedłużając życie o kilka, kilkanaście miesięcy. Interwencja operacyjna przyczynia się do złagodzenia następstw choroby nowotworowej, nie prowadzi do wyleczenia chorego.

Z uwagi na niezadowalające wyniki leczenia chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa podjętem temat dotyczący zjawisk molekularnych związanych z kaskadą przerzutu nowotworowego (metastatic cascade) i osteoklastogenezy nowotworowej. Dotychczas wyniki takich badań nie były publikowane.

Zjawiska związane z powstawaniem przerzutów nowotworowych są procesami złożonymi, wieloetapowymi, wykazującymi związek komórek nowotworowych z ich zdolnością do aktywności proteolitycznej, degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, migracji, aktywności proliferacyjnej w miejscu zasiedlenia oraz zdolnością do angiogenezy. W niniejszej pracy podjęta analiza mechanizmów molekularnych kaskady choroby nowotworowej, na każdym jej etapie, w przypadkach przerzutów do kręgosłupa. Zostały zbadane we krwi wskaźniki biochemiczne odzwierciedlające aktywność proteolityczną, degradację macierzy zewnątrzkomórkowej, migracji, proliferacji i zdolność do angiogenezy. Przeprowadzono te badania układu RANK/RANKL/OPG w odniesieniu do regulacji osteoklastogenezy nowotworowej.

Uważam, że wyniki tych badań mogą mieć implikacje kliniczne. Zrozumienie komórkowych procesów odpowiedzialnych za rozsiew nowotworów i poznanie molekularnych markerów inwazyjności może być użyteczne nie tylko do udoskonalania diagnostyki i prognozowania przebiegu choroby, ale także do wprowadzenia nowych schematów terapeutycznych.

Celami pracy są :

1. Ustalenie profilu wskaźników biochemicznych kaskady i osteoklastogenezy nowotworowej charakterystycznych dla przerzutów nowotworowych do kręgosłupa z poszczególnych narządów.
2. Korelacja aktywności markerów biochemicznych z wynikami badań klinicznych i skalami klinimetrycznymi.
3. Poszukiwanie implikacji klinicznych.

4. Materiał kliniczny i metodyka badań

4.1. Materiał kliniczny

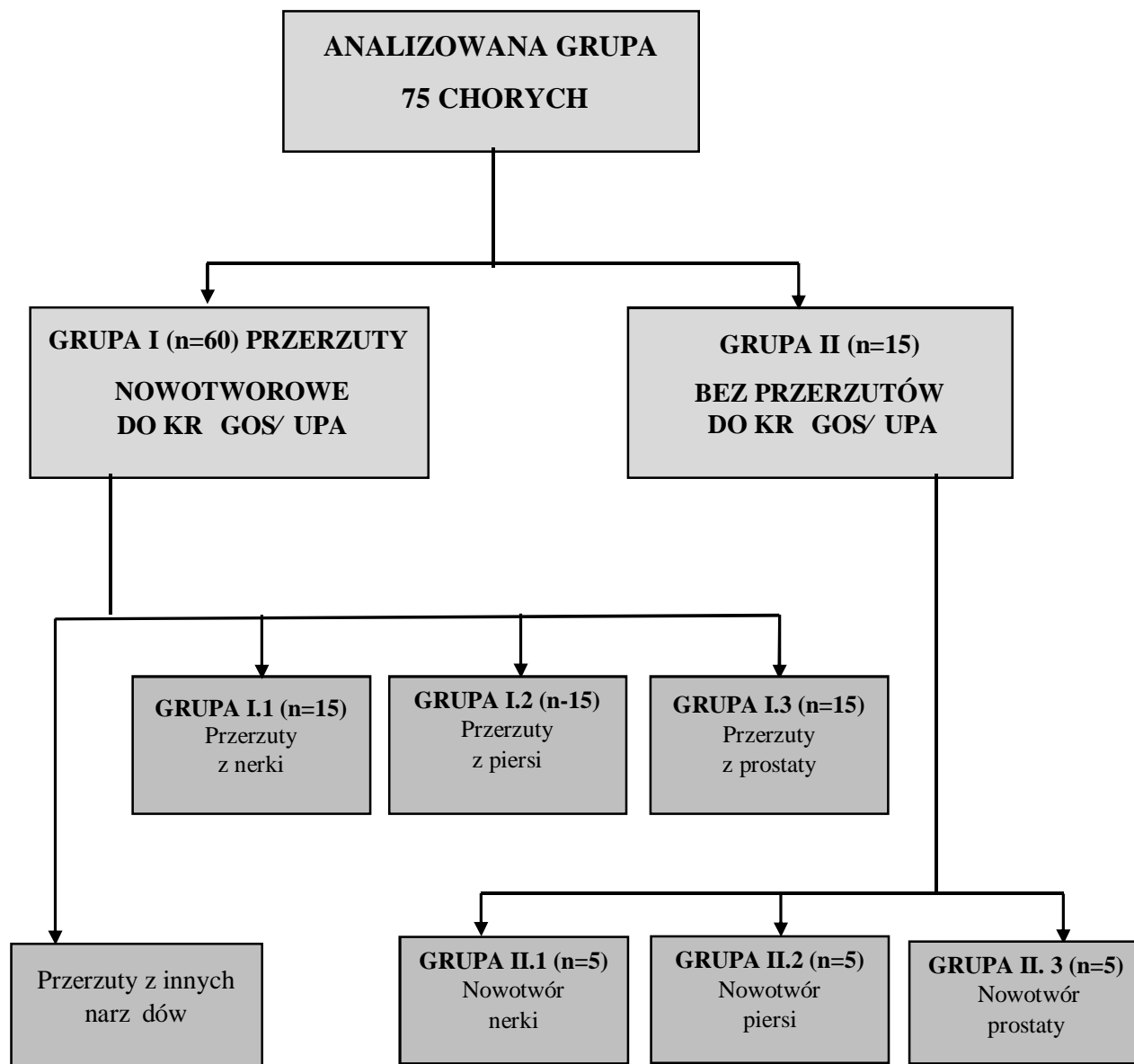
Przeprowadzone badania miały charakter prospektywny. Analiz objęto 75 chorych leczonych operacyjnie i zachowawczo z powodu przerzutów nowotworowych do kręgosłupa od 1.02.2014 roku do 31.01.2016 roku w Oddziałach Szpitala Klinicznego nr 2 UM w Poznaniu (Neurochirurgii, Neurologii, Endokrynologii), w Klinice Onkologii UM w Poznaniu, Oddziale Urologii i Onkologii Urologicznej Szpitala w Rodziny w Poznaniu. Analizowany materiał obejmował 75 chorych, 38 (51, 25 %) kobiet i 37 (48, 75 %) mężczyzn, w wieku od 35 do 83 lat (średnia wieku wynosiła 64 lata). Do badania zakwalifikowano dorosłych pacjentów z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa ze znanym ogniskiem pierwotnym.

Z badania wykluczono chorych, u których przerzut do kręgosłupa był pierwszym objawem choroby nowotworowej, a na podstawie wykonanych badań klinicznych nie udało się jednoznacznie określić ogniska pierwotnego.

Chory był informowany o możliwości uczestnictwa w badaniu. Otrzymywał informacje pisemne i wyczerpujące informacje ustne o celu prowadzonego badania oraz został zapewniony o anonimowości danych (załącznik 12. 1). Wszystkie osoby biorące udział w badaniu zostały poinformowane, że jest ono całkowicie dobrowolne. Każdy pacjent po zapoznaniu się z informacjami pisemnymi i wyjaśnieniami ustnymi, po ich zaakceptowaniu, podpisywał zgodę na udział w badaniu (załącznik 12. 2).

Pierwsza grupa badawcza (Grupa I) obejmowała 60 osób z ustalonym ogniskiem pierwotnym (rycina. 3). Grupa I została podzielona na cztery podgrupy w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego (podgrupa I.1, przerzuty do kręgosłupa z nerki n=15, podgrupa I.2, przerzuty z piersi n=15, podgrupa I.3, przerzuty z prostaty n=15, podgrupa I.4, przerzuty z innych narządów: tarczyca, pętlą, przewód pokarmowy, nadnercze n=15).

Drugą grupą badawczą (Grupa II, kontrolna) stanowiło 15 chorych ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym, przed jego operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa. Grupa II została podzielona na trzy podgrupy. Kryterium podziału stanowiła lokalizacja ogniska pierwotnego (podgrupa II.1 nowotwór nerki n=5, podgrupa II.2 nowotwór piersi n=5, podgrupa II.3 nowotwór prostaty, n=5).



Rycina 3. Grupy badawcza i kontrolna

4.1.1. Charakterystyka kliniczna Grupy I. Chorzy z przerzutami do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym.

W grupie I znajdowało się 60 chorych z przerzutami do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym: 30 (50%) kobiet i 30 (50%) mężczyzn w wieku od 35 do 90 lat (mediana 64 lata). Wywiad chorobowy wynosił od 1 do 224 miesięcy (mediana 24 miesięcy). Choroby współistniejące odnotowano w 38 (63%) przypadkach. Najczęściej chorzy leczeni byli z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego 35 (58%) i cukrzycy 9 (15%) przypadków. W zakresie skali VAS chorzy zgłaszali ból o nasileniu lekkim 16 (26%),

rednim, 13 (22%), silnym (30%) i maksymalnym 13 (22%) chorych. W badaniu neurologicznym u 21 (34%) wyst powa€znaczny niedow€d ko czyn (stopnie A, B i C wg skali Frankl€), a u 40 (66%) chorych by€ zachowana u yteczna funkcja ruchowa w zakresie ko czyn pomimo obecno ci niedow€du lub nie stwierdzono ubytkowych objawów neurologicznych (stopnie D i E wg skali Frankl€). Stan ogólny chorego oceniono w skali Karnofsky€go. 51 (84 %) osób by€ samodzielnych (70 €100 punktów), a 10 (16%) osób wymaga€ opieki i pomocy w czynno ciach ycia codziennego (poni ej 70 punktów). Najcz €iej nowotwór by€ zlokalizowany w odcinku piersiowym kr gos€pa u 31 (52%) chorych, rzadziej w odcinku l d wiowym u 24 (40%) i szyjnym u 5 (8%) pacjentów. Z powodu ogniska pierwotnego 30 (49%) chorych by€ leczonych operacyjnie. Rozpoznanie histologiczne nowotworów, ustalone na podstawie materia€ uzyskanego podczas operacji lub biopsji ogniska pierwotnego by€ nast puj ce: nerka € rak jasnokomórkowy 15 (25%), pier € rak p€cikowy 15 (25%), prostata € gruczolakorak 15 (25%) i inne: p€co 8 (13%); drobnokomórkowy 4, niedrobnokomórkowy 2, nieokre lony 2 (3%), przewód pokarmowy 4 (6%); gruczolakorak 3 i rak dróg €ciowych 1, tarczycza € rak rdzeniasty 2 (3%), rak nadnercza, (chromoch€nny) 1 (2%). Dane dotycz ce wyniku leczenia, po okresie co najmniej roku obserwacji, uzyskano od 50 chorych. Korzystny wynik leczenia (popraw lub stabilizacj stanu zdrowia) uzyskano u 25 (50%) chorych, a niekorzystny wynik leczenia (pogorszenie stanu zdrowia, zgon) odnotowano u 25 (50%) chorych.

4.1.2. Charakterystyka kliniczna podgrupy I.1. Przerzuty do kr gos€pa z raka nerki.

Grupa I.1 stanowi€ 15 pacjentów: 6 (40%) kobiet i 9 (60%) m czyzn, u których na podstawie bada histopatologicznych rozpoznano raka jasnokomórkowego nerki z przerzutami do kr gos€pa. Wiek chorych wynosi€ od 59 do 75 lat (mediana 66 lat). Zabieg nefrektomii by€ wykonany u 12 (80%) chorych. Wywiad chorobowy wynosi€ od 1 do 168 miesi cy (mediana 18 miesi cy). Z chorób towarzyszcych najcz €iej wyst powa€ nadci nienie t nicze 11 (73%), cukrzyca 2 (13%), stan po zawale serca 2 (13%), zaburzenia rytmu serca 1 (7%), niedoczynno tarczycy 1 (7%). W skali VAS u 5 (33%) chorych odnotowano lekki ból, 5 (33%) redni, 2 (13%) silny i 3 (20%) chorych ból o maksymalnym nat eniu. W badaniu neurologicznym u 9 (60%) wyst powa€znaczny niedow€d ko czyn (stopnie A B i C wg skali Frankl€), a u 6 (40%) chorych by€ zachowana u yteczna funkcja ruchowa w zakresie ko czyn pomimo obecno ci niedow€du lub nie stwierdzono ubytkowych objawów neurologicznych (stopnie D i E wg skali Frankl€).

W skali Karnofsky'ego 10 (67%) osób było samodzielnych (70 - 100 punktów), a 5 (33%) osób wymagało opieki i pomocy w czynnościach życia codziennego (poniżej 70 punktów). Najczęściej nowotwór był zlokalizowany w odcinku lędźwiowym kręgosłupa u 8 (53%) chorych, rzadziej w odcinku piersiowym kręgosłupa w 7 (47%) przypadkach. Informacje dotyczące wyniku leczenia uzyskano od 12 (80%) chorych. Korzystny wynik leczenia uzyskano u 9 (75%) chorych, a niekorzystny wynik odnotowano u 3 (25%) chorych.

4.1.3. Charakterystyka kliniczna podgrupy I.2. Przerzuty do kręgosłupa z raka piersi.

W badanej grupie było 15 kobiet leczonych z powodu raka pęłcikowego piersi z obecno ci przerzutów do kręgosłupa. Wiek pacjentek wynosił od 35 do 78 lat (mediana 61 lat). Z powodu ogniska pierwotnego było leczonych operacyjnie 9 (60%) kobiet. Wywiad chorobowy wynosił od 1 do 224 miesi cy (mediana 60 miesi cy). Pacjentki leczone były równie z powodu nadci nienia t tniczego 6 (40%), cukrzycy 1 (7%) i przewlekłej obturacyjnej choroby pęłc 1 (7%). Nasilenie bólu wg skali VAS było nast puj ce: 7 (47%) prezentowało lekki ból, 3 (20%) redni, a 5 (33%) silny ból. Wszystkie pacjentki były samodzielne w czynno ciach życia codziennego (powy ej 70 punktów w skali Kornofsky'ego). Stan neurologiczny uznano za dobry u 12 (80%) pacjentek (w skali Frankla stopnie D i E), pozostało 3 (20%) chore w stanie zym (w skali Frankla stopnie A, B i C). Najczęściej nowotwór był zlokalizowany w odcinku piersiowym u 10 (67%) chorych, rzadziej w odcinku lędźwiowym kręgosłupa u 3 (20 %) i szyjnym u 2 (13%) pacjentów. Wynik leczenia został ustalony u 14 (93%) kobiet. Korzystny wynik leczenia uzyskano u 8 (57%) pacjentek, a niekorzystny wynik odnotowano u 6 (43%) kobiet.

4.1.4. Charakterystyka kliniczna podgrupy I.3. Przerzuty do kręgosłupa z raka prostaty.

Analizowana grupa stanowiła 15 chorych z przerzutami do kręgosłupa z gruczolakoraka prostaty. Chorzy byli w wieku od 56 do 90 lat (mediana 68 lat). Wszyscy pacjenci ze wzgl du na obecno przerzutów w szkielecie kostnym byli zdyskwalifikowani z operacji ogniska pierwotnego. Wywiad chorobowy wynosił od 3 do 96 miesi cy (mediana 21 miesi cy). Pacjenci poza chorob nowotworow byli leczeni z powodu: nadci nienia t tniczego 11 (73%), zawał mi nia sercowego 3 (20%) i niedoczynno ci tarczycy 2 (13%).

Nasilenie bólu wg skali VAS było różne. Lekki ból stwierdzono u 6 (40%) chorych, średni u 6 (40%), silny u 2 (13%) i bardzo silny ból 1 (7%) osoby. Wszyscy pacjenci byli samodzielni w czynnościach życia codziennego (powyżej 70 punktów w skali Karnofsky'ego). Stan neurologiczny uznano za dobry u 14 (93%) chorych (w skali Frankla stopnie D i E), u 1 (7%) chorego odnotowano stopień C w skali Frankla. Najczęściej nowotwór był zlokalizowany w odcinku lędźwiowym kręgosłupa u 9 (60%) chorych, rzadziej w odcinku piersiowym u 6 (40%) pacjentów. Informacje dotyczące wyniku leczenia uzyskano od 11 (73%) chorych. Korzystny wynik leczenia uzyskano u 7 (64%) chorych, a niekorzystny wynik odnotowano u 4 (36%) pacjentów.

4.1.5. Charakterystyka kliniczna podgrupy I.4. Przerzuty do kręgosłupa z innych narządów.

Grupa I.4 stanowi 15 chorych, 9 (60%) kobiet i 6 (40%) mężczyzn z przerzutami do kręgosłupa pochodzącymi z raka pęcherza 8 (53%), przewodu pokarmowego 4 (27%), tarczycy 2 (13%) i nadnerczy 1 (7%). Osoby w badanej grupie były w wieku od 36 do 69 lat (mediana 58 lat). Pacjenci byli leczeni z powodu choroby nowotworowej od 1 do 120 miesięcy. Wśród współistniejących chorób były: nadciśnienie tętnicze 6 (40%), cukrzyca 2 (13%) i zaburzenia rytmu serca 1 (7%). Według skali VAS 4 (27%) chorych zgłaszały ból o lekkim nasileniu, 4 (27%) o średnim, 5 (33%) o silnym i 2 (13%) chorych o bardzo silnym nasileniu. 8 (53%) chorych znajdowały się w grupie pacjentów z deficytami neurologicznymi i niedowładami umożliwiającymi samodzielne poruszanie się (stopnie A, B, C), natomiast 7 (47%) osób zostały sklasyfikowanych w stopniach D, E w skali Frankla. W skali Karnofsky'ego 10 (67%) pacjentów było samodzielnych (powyżej 70 punktów), a 5 (33%) osób wymagały opieki i pomocy w czynnościach życia codziennego (poniżej 70 punktów). Najczęściej nowotwór zlokalizowany był w odcinku piersiowym u 8 (53%) chorych, w odcinku lędźwiowym kręgosłupa u 4 (27%), a w odcinku szyjnym u 3 (20%) pacjentów. Wynik leczenia ustalono u 10 (67%) chorych. Korzystny wynik leczenia uzyskano u 1 (7%) chorych, a niekorzystny wynik odnotowano u 9 (90%) pacjentów.

4.1.6. Charakterystyka kliniczna Grupy II. Grupa kontrolna.

Chorzy ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym, przed jego operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa.

W II grupie kontrolnej znajdowało się 15 chorych ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym w nerce, piersi lub prostaty, przed operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa; 8 (57%) kobiet i 7 (43%) mężczyzn, w wieku od 45 do 76 lat (mediana 63 lat, min. 45, max. 76). W tej grupie chorych stwierdzono nadciśnienie tętnicze u 3 (22%) chorych, cukrzycę 1 (7%), chorobę tarczycy 1 (7%) i chorobę niedokrwienną serca 1 (7%). Poziom wapnia w osoczu krwi wynosił od 3,92 mmol/l do 4,85 mmol/l (mediana 4,36 mmol/l), a fosfatazy zasadowej od 40 U/l do 91 U/l (mediana 55 U/l).

4.1.7. Charakterystyka kliniczna podgrupy II.1 z nowotworu nerki

Grupa II.1 stanowiła 5 chorych: 3 kobiety i 2 mężczyzn w wieku od 55 do 76 lat (mediana 62 lata). Chorzy ci zostali włączeni do badania przed operacją nefrektomii z powodu raka jasnokomórkowego nerki. Nadciśnienie tętnicze i cukrzycę stwierdzono u 1 chorej. Poziom wapnia w osoczu krwi wynosił od 3,92 mmol/l do 4,39 mmol/l (mediana 4,53 mmol/l), a fosfatazy zasadowej od 40 U/l do 66 U/l (mediana 57 U/l).

4.1.8. Charakterystyka kliniczna podgrupy II.2 z nowotworu piersi

Do grupy II.2 zaliczono 5 kobiet w wieku od 45 do 74 lat (mediana 48 lat). Chore poddane zostały operacji mastektomii. U pacjentek nie stwierdzono współistniejących chorób. Poziom wapnia wynosił od 4,1 mmol/l do 4,45 mmol/l (mediana 4,34 mmol/l), a fosfatazy zasadowej od 47 U/l do 62 U/l (mediana 53 U/l).

4.1.9. Charakterystyka kliniczna podgrupy II.3 z nowotworu prostaty

W grupie II.3 było 5 mężczyzn w wieku od 64 do 73 lat (mediana 68 lat). Chorzy zostali poddani operacji prostatektomii. Nadciśnienie tętnicze stwierdzono u 2 osób. Poziom wapnia wynosił od 4,11 mmol/l do 4,85 mmol/l (mediana 4,6 mmol/l), a fosfatazy zasadowej od 48 U/l do 91 U/l (mediana 73 U/l).

4.2. Metodyka bada

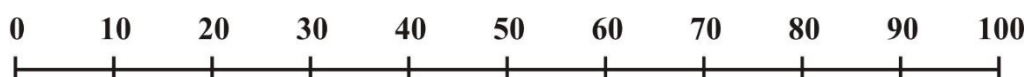
Analiza danych obejmowała czynniki socjodemograficzne, informacje z wywiadu chorobowego: lokalizacj ogniska pierwotnego, okres czasu trwania choroby nowotworowej, informacje o operacji ogniska pierwotnego, dane dotycz ce leczenia onkologicznego (chemioterapia, radioterapia, hormonoterapia, bifosfoniany), umiejscowienie ogniska przerzutowego w kr goscpie, okres dugo ci czasu trwania objawów zwi zanych z przerzutem do kr goscpa, informacje o innych ogniskach przerzutów nowotworowych w szkielecie kostnym i narz dach wewn trznych i choroby współcstniej ce.

Ocena stanu klinicznego chorych oparta została na szczegóowej analizie danych z wywiadu, badania internistycznego, neurologicznego i wyników bada dodatkowych uzyskanych z historii chorób.

Rozpoznanie kliniczne choroby nowotworowej kr goscpa zostało ustalone na podstawie bada tomografii kr goscpa (KT), rezonansu magnetycznego kr goscpa (MR), badania scyntygraficznego ko ci z wykorzystaniem izotopu technetu (HMDP-Tc99m) i pozytronowej tomografii emisyjnej (PET). Lokalizacja ogniska pierwotnego nowotworu została potwierdzona badaniem histologicznym.

Powy sze dane i informacje dotycz ce badania internistycznego i neurologicznego oraz wyników bada diagnostycznych wykorzystano w skalach klinimetrycznych.

Pacjent okre lał nat enie bólu za pomoc wizualnej skali analogowej (VAS), zaznaczaj c punkt na linii dugo ci 100 mm, na której warto ci 0 przypisuje si całkowity brak bólu, a warto ci 100 mm najgorszy mo liwy ból (ryc. 4). Wyniki w zakresie skali VAS interpretuje si nast puj co: od 1 mm do 25 mm oznacza wyst powanie lekkiego bólu, od 26 do 50 mm ó redniego bólu, od 51mm do 75 mm ó silnego bólu, a od 76 mm do 100 mm ó oznacza wyst powanie maksymalnego bólu.



Rycina 4. Skala numeryczna oceny bólu wg Dom aET. [36].

Stopie niedowodu ko czyn dolnych określono w oparciu o skal Frankela, która dokonuje podziału chorych na pi kategorii od A do E (tabela 1.) [25].

Tabela 1. Skala Frankela

GRUPA A ó całkowite zniesienie funkcji ruchowych i czuciowych poniżej poziomu uszkodzenia

GRUPA B ó zachowane czucie, ale bez czynności ruchowej

GRUPA C ó zachowana, ale bezużyteczna funkcja ruchowa

GRUPA D ó zachowana funkcja ruchowa pomimo

GRUPA E ó brak deficytu neurologicznego

Stan ogólny chorego oceniono w skali Karnofsky'ego (tabela 2) [132]. Skala pozwala określić stan ogólny i jakością życia pacjenta z chorobą. Skala ma rozpiętość od 100 do 0, gdzie 100 oznacza stan prawidłowy, 0 ó zgon.

Tabela 2. Ocena stanu ogólnego w skali Karnofsky'ego

Stopień sprawności	Opis
100	Stan prawidłowy, brak dolegliwości i objawów choroby
90	Stan prawidłowej aktywności, niewielkie dolegliwości i objawy choroby
80	Stan niemal pełnej aktywności (wymaga pewnego wysiłku) niewielkie dolegliwości i objawy choroby
70	Stan niemożności wykonywania pracy lub prawidłowej aktywności, przy zachowanej zdolności do samoobsługi
60	Stan wymagający okresowej opieki, przy zachowanej zdolności do samodzielnego spełniania większości codziennych potrzeb
50	Stan wymagający ciągłej opieki i częstych interwencji medycznych
40	Stan niewydolności i konieczności szczególnej opieki
30	Stan poważnej niewydolności, wskazania do hospitalizacji
20	Stan poważnej choroby, bezwzględnie konieczności hospitalizacji i prowadzenia leczenia wspomagającego
10	Stan gwałtownego narastania zagrożenia życia
0	Zgon

W stanie ogólnym chorego analizowano współistnienie choroby i stopień zaawansowania choroby nowotworowej skala De Wald'a [33]. De Wald i wsp. ocenili stopień zaawansowania choroby nowotworowej na podstawie stanu immunologicznego chorego, stopnia

uszkodzenia struktur kostnych kręgosłupa i rdzenia kręgowego. Kluczowymi kryteriami dla rozpoznania immunosupresji są obniżenie poziomu krwinek białych poniżej 1 000, a płytek krwi poniżej 80 000. Zależnie od stopnia nasilenia zmian, po dokonaniu oceny stanu hematologicznego, uszkodzenia kręgosłupa i układu nerwowego, chory klasyfikowany jest w jednym z pięciu stopni skali (tabela 3) [33].

Tabela 3. Stopień zaawansowania choroby nowotworowej wg skali De Waldę

Stopień Objawy

- I. Prawidłowy stan immunologiczny, subiektywne objawy neurologiczne ó umiarkowany ból, zniszczenie struktur kostnych ó bez zmniejszenia osi kręgosłupa
- II. Prawidłowy stan immunologiczny, ból, zęmanie patologiczne kręgu z nieznacznym zmniejszeniem osi kręgosłupa
- III. Objawy immunosupresji, ból, zęmanie patologiczne kręgu z nieznacznym zmniejszeniem osi kręgosłupa
- IV. Prawidłowy stan immunologiczny, ubytkowe objawy neurologiczne, zęmanie patologiczne kręgu ze znacznym zmniejszeniem osi kręgosłupa
- V. Objawy uogólnionej immunosupresji, zespół Caudęrowitego poprzecznego uszkodzenia rdzenia, zęmanie patologiczne kręgu ze znacznym zmniejszeniem osi kręgosłupa

Do prognozowania długości przeżycia chorych z nowotworami przerzutowymi do kręgosłupa wykorzystujemy skalę Tokuhashi i wsp. Skala uwzględnia stan ogólny chorego na podstawie indeksu Karnofskyęgo, liczbę ognisk przerzutowych poza układem kostnym, liczbę ognisk przerzutowych w kręgosłupie, liczbę ognisk przerzutowych poza kręgosłupem, obecność przerzutów do narządów wewnętrznych w aspekcie leczenia operacyjnego, umiejscowienie pierwotnego nowotworu i stan neurologiczny chorego (tabela 4) [143]. Prognozowany czas przeżycia uzależniony jest od sumy uzyskanych punktów: poniżej 8 punktów ó przeżycie wynosi poniżej 3 miesięcy, od 9 do 11 punktów ó do 12 miesięcy, od 12 do 15 punktów okres przeżycia jest dłuższy niż 12 miesięcy.

Tabela 4. Skala Tokuhashi Y i wsp. [143].

Wskaźniki	punkty
stan ogólny wg skali Kornofsky'ego	
zły (10% - 40%)	0
umiarkowany (50% - 70%)	1
dobry (80% - 100%)	2
liczba ognisk przerzutowych poza układem kostnym	
> 3	0
1 ó 2	1
0	2
liczba ognisk przerzutowych w kręgosłupie	
> 3	0
1 ó 2	1
0	2
przerzuty w narządach wewnętrznych	
niedostępne do leczenia operacyjnego	0
dostępne do leczenia operacyjnego	1
nieobecne	2
umieszczenie pierwotnego nowotworu	
pełna, miśsiak kostny, ośrodek, płuca, przełyk, trzustka	0
w tymba, płuca, óciowy, nieustalone	1
inne	2
nerki, moczowody	3
odbytnica	4
tarczycy, pierś, prostata, guz o charakterze raka	5
stan neurologiczny (uszkodzenie rdzenia wg skali Frankel'a)	
zespół poprzeczny całkowity, stopnie A, B	0
zespół poprzeczny czciowy, stopnie C, D	1
bez objawów uszkodzenia, stopie E	2

Badania immunoenzymatyczne wykonano u każdego chorego. Krew do badania, objętości 15 ml, pobierano od pacjentów z wyjątkiem promieniowej na skrzep i po około 30 minutach zawartość próbek wirowano z szybkością 1 000 x g w ciągu 10 minut. Po odwirowaniu surowic zbierano do próbek w ilości 0,5 ml i zamrażano w temp. -80 C.

Przeprowadzono badania immunoenzymatyczne ekspresji markerów molekularnych biorących udział w mechanizmie kaskady nowotworowej. Badania zostały wykonane przy użyciu testów z wykorzystaniem metody ELISA w Laboratorium Zakładu Neurochemii i Neuropatologii Katedry Neurologii UM w Poznaniu (tabela 5).

Tabela 5. Markery molekularne

L.p.	Biomarkery	Firma	Czułość testu
1	MMP9 (metyloproteinaza 9)	R&D System	od 0,014 do 0,082ng/mL
2	MMP2 (metyloproteinaza 2)	R&D System	0,156 ng/mL
3	OPN (osteopontyna)	Abcam	<50 pg/mL
4	tPA (tkankowy aktywator plazminogenu)	R&D System	1,40-16,1 pg/mL
5	uPA (urokinazowy aktywator plazminogenu)	R&D System	0,931-4,17 pg/mL
6	VEGF 165b (naczyniowy różniczkowy czynnik wzrostu 165b)	R&D System	10 pg/ml
7	Receptor CD44	Abcam	0,113 ng/mL
8	OPG (osteoprotegryna)	eBioscience An Affymetix Company+-	2,5 pg/mL
9	RANK (receptor aktywujący drożdżowy czynnik NF- B)	Wuhan EIAab Science CO.Ltd	0,156-10 ng/mL
10	RANKL (ligand receptora aktywującego drożdżowy czynnik NF- B)	Wuhan EIAab Science CO.Ltd	0,067 ng/mL

Uzupełniamy tymi badaniami były oznaczenia stężenia: wapnia zjonizowanego Ca^{++} i alkalicznej fosfatazy ALP. Do ilościowej oceny poziomu Ca^{++} w surowicy krwi wykorzystano metodę (ISE) elektrody jonoselektywne. Badania wykonano na analizatorze AVL 9180 firmy Roche Diagnostic. Norma w granicach od 2,1 do 2,6 mmol/l. Do ilościowej oceny poziomu alkalicznej fosfatazy w surowicy krwi wykorzystano metodę kalometryczną na analizatorze Cobas 6000 firmy Roche Diagnostic. Norma w granicach od 30 do 120 U/l. Badania zostały wykonane w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego UM w Poznaniu.

Badanie kontrolne zostało wywiad telefoniczny przeprowadzono, co najmniej, po dwunastu miesiącach (od marca 2017 r.) od zwolnienia chorego ze szpitala. Uzyskane dane o stanie zdrowia chorego oceniono w czterostopniowej skali.

1. Poprawa stanu zdrowia
2. Stan stabilny
3. Pogorszenie stanu zdrowia
4. Zgon

Materiał badawczy został zgromadzony w arkuszu kalkulacyjnym Microsoft Office Excel 1997 ó 2003. W zakresie statystyki cech ilościowych określono wartości minimalną, maksymalną i medianę. W zakresie cech jakościowych podano liczbę jednostek należących do wyróżnionych kategorii danej cechy i odpowiadające im wartości procentowe. Ze względu na to, że w przypadku rozpatrywanych cech nie miało zastosowania rozkład normalny, do weryfikacji hipotez użyte zostały testy nieparametryczne.

Badana grupa stanowiła 75 osób, ale w związku z tym analizy wykonywane były na jej podgrupach. Liczono je w poszczególnych podgrupach, aby zapewnić wiarygodność wyników, przy małych liczebnościach podgrup, oprócz standardowych testów opartych na rozkładach asymptotycznych wykorzystano metody dokładne (exact) i symulacji Monte Carlo.

Do ustalenia zależności między cechami ilościowymi lub wyrażonymi na skali porządkowej użyto współczynnika zależności monotonicznej Spearmana, oraz wyliczono jego istotność statystyczną podając wartość p asymptotyczną. Dla porównania cechy wyrażonej na skali interwałowej lub porządkowej pomiędzy dwiema grupami zastosowano Test Manna-Whitneya. Gdy cecha miała więcej niż dwie kategorie, obliczenia dokonano za pomocą testu Kruskala-Wallisa wyznaczając wartość p asymptotyczną. Za graniczny poziom istotności statystycznej przyjęto $p < 0,05$. Obliczenia statystyczne zostały wykonane za pomocą pakietów statystycznych PQStat v1.6.2 i StatXact v11.

Zgodnie z wyrażeniem zgody na prowadzenie badań Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu nr 145/2014 (załącznik nr. 12.3)

5. Wyniki badań

5.1. Porównanie wartości wskaźników kaskady nowotworowej i osteoklastogenezy nowotworowej w poszczególnych grupach badawczych z grupą kontrolną

5.1.1. Grupa I, wszyscy analizowani pacjenci, z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym nowotworu

Wartości median aktywności wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa z ustalonym ogniskiem pierwotnym, n=60 (Grupa I) i ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym, przed jego operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa, n=15 ów grupa kontrolna (Grupa II) zostały przedstawione w tabeli 6. Wartości median MMP2, CD44, tPA, OPN były wyższe, natomiast wartości MMP9, uPA były niższe w grupie I od wartości median stwierdzonych w grupie II. W analizie statystycznej wykazał istotnie statystyczne różnice w zakresie MMP9, tPA, OPN pomiędzy grupą I a grupą kontrolną (ryc. 5, 6 i 7).

Tabela 6. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa z ustalonym ogniskiem pierwotnym i w grupie kontrolnej

Wskaźnik biochemiczny	Grupa I n=60	Grupa II n=15	Analiza statystyczna
MMP9 (ng/ml)	423,34 (70,18; 2222,62) ⁺	766,189 (209,91; 1970,96)	p= 0,01⁺⁺
MMP2 (ng/ml)	223,98 (102,95; 711,17)	205,18 (141,82; 285,32)	NS ⁺⁺⁺
CD44 (ng/ml)	160,80 (37,07; 772,77)	137,94 (102,6; 183,78)	NS
tPA (pg/ml)	5277,10 (1748,67; 30487,98)	3521,48 (1087,70; 240825)	p= 0,003
uPA (pg/ml)	657,81 (266,97; 2194,25)	671,72 (487,28; 1653,27)	NS
OPN (pg/ml)	24454,93 (0,00; 259355,19)	9046,28 (0,00; 35920,41)	p=0,01

⁺ mediana (wartość minimalna i maksymalna)

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ nieznamienne statystycznie

Tabela 7 przedstawia wartości median aktywności wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w grupach chorych: z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa z ustalonym ogniskiem pierwotnym (Grupa I) i ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym, przed jego operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa (Grupa II). Wartości median RANK, RANKL, OPG w grupie I były wyższe od wartości median w grupie II. Przeprowadzone obliczenia statystyczne wykazały zależność statystycznie w zakresie aktywności OPG pomiędzy grupą I a grupą II (ryc. 8).

Tabela 7. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w grupie chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa z ustalonym ogniskiem pierwotnym i w grupie kontrolnej

Wskaźnik	Grupa I n=60	Grupa II n=15	Analiza statystyczna
RANK (ng/ml)	0,17 (0,00; 2,41) ⁺	0,00 (0,00; 0,92)	NS ⁺⁺⁺
RANKL (ng/ml)	0,30 (0,04; 3,23)	0,135 (0,08; 0,62)	NS
OPG (pg/ml)	96,32 (26,91; 1746,32)	63,52 (28,81; 606,44)	p=0,01⁺⁺

⁺ mediana (wartość minimalna i maksymalna)

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ nieznamienne statystycznie

5.1.2. Podgrupa I.1. Chorzy na raka nerki z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa.

Wartości median aktywności wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej u chorych na raka nerki z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa, n=15 (podgrupa I.1) i w podgrupie kontrolnej, n=5 (podgrupa II.1) ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym w nerce, przed jego operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa przedstawia tabela 8. Wartości median MMP2, CD44, tPA, OPN były wyższe, natomiast wartości MMP9, uPA były niższe w grupie I.1, od wartości median stwierdzonych w podgrupie kontrolnej II.1. W analizie statystycznej wykazaliśmy istotne statystycznie różnice w zakresie MMP9 pomiędzy podgrupami I.1, a kontrolną II.1 (ryc. 9).

Tabela 8. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutami nowotworowymi i podgrupie kontrolnej

Wskaźnik	Grupa I.1 n=15	Grupa II.1 n=5	Analiza statystyczna
MMP9 (ng/ml)	422,24 (151,95; 1083,85) ⁺	1311,33 (492,72; 1970,96)	p=0,004⁺⁺
MMP2 (ng/ml)	241,91 (170,51; 312,55)	199,24 (155,86; 216,77)	NS ⁺⁺⁺
CD44 (ng/ml)	156,71 (74,38; 251,14)	164,75 (102,60; 168,66)	NS
tPA (pg/ml)	6442,84 (1748,67; 16562,83)	2643,58 (2165,11; 240825,00)	NS
uPA (pg/ml)	620,10 (288,20; 911,09)	681,40 (632,00; 1653,27)	NS
OPN (pg/ml)	24454,93 (0,00; 191394,87)	29818,85 (0,00; 35920,41)	NS

⁺ mediana (wartość minimalna i maksymalna)

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ nieznamienne statystycznie

Tabela 9 przedstawia wartości median aktywności wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa (podgrupa I.1) i podgrupie II.1 ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym w nerce, przed jego operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa. Wartości median RANK, RANKL, OPG w grupie I.1 były wyższe od wartości

median w podgrupie kontrolnej II.1. Przeprowadzone obliczenia statystyczne nie wykazały istotnych zależności w zakresie aktywności RANK, RANKL, OPG pomiędzy podgrupą I.1 a podgrupą kontrolną (II.1).

Tabela 9. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i podgrupie kontrolnej

Wskaźnik	Grupa I.1 n=15	Grupa II.1 n=5	Analiza statystyczna
RANK (ng/ml)	0,49 (0,00; 1,05) ⁺	0,00 (0,00; 0,770)	NS ⁺⁺
RANKL (ng/ml)	0,19 (0,04; 1,00)	0,13 (0,08; 0,59)	NS
OPG (pg/ml)	100,61 (50,94; 275,77)	84,12 (31,72; 606,44)	NS

⁺ mediana (wartość minimalna i maksymalna)

⁺⁺ nieznamienna statystycznie

5.1.3. Podgrupa I.2. Chore na raka piersi z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa.

Wartości median aktywności wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej u chorych na raka piersi z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa, n=15 (podgrupa I.2) i podgrupie II.2, n=5, ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym w piersi, przed jego operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa przedstawia tabela 10. Wartości median MMP2, CD44, tPA, uPA, OPN były wyższe, natomiast wartości mediany MMP9 były niższe w grupie I.2, od wartości median stwierdzonych w podgrupie kontrolnej II.2. W analizie statystycznej nie wykazaliśmy istotnych statystycznie różnic w zakresie analizowanych wskaźników kaskady nowotworowej pomiędzy podgrupami I.2 a kontrolną II.2.

Tabela 10. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka piersi z przerzutami nowotworowymi i podgrupie kontrolnej

Wskaźnik	Grupa I.2 n=15	Grupa II.2 n=5	Analiza statystyczna
MMP9 (ng/ml)	277,83 (70,18; 951,76) ⁺	450,61 (209,91; 1174,88)	NS ⁺⁺
MMP2 (ng/ml)	257,38 (142,75; 711,17)	221,47 (141,82; 285,32)	NS
CD44 (ng/ml)	183,78 (67,69; 772,77)	144,38 (122,20; 183,78)	NS
tPA (pg/ml)	5159,63 (2239,74; 30487,98)	4169,44 (1087,70; 6995,40)	NS
uPA (pg/ml)	815,09 (485,30; 2194,25)	699,94 (512,02; 921,12)	NS
OPN (pg/ml)	18943,34 (372,21; 151845,41)	8291,00 (3352,19; 20079,34)	NS

⁺ mediana (wartość minimalna i maksymalna)

⁺⁺ nieznamienna statystycznie

Tabela 11 przedstawia wartości median aktywności wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie I.2 chorych na raka piersi z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i podgrupie kontrolnej II.2 ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym piersi, przed jego operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa. Wartości median, RANKL, OPG, w podgrupie I.2 były wyższe, a wartości mediany RANK były niższe od wartości median w podgrupie kontrolnej. Przeprowadzone obliczenia statystyczne wykazały zależność istotną w zakresie aktywności RANKL pomiędzy podgrupą I.2 a podgrupą kontrolną (ryc. 10).

Tabela 11. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka piersi z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i podgrupie kontrolnej

Wskaźnik	Grupa I n=15	Grupa II n=5	Analiza statystyczna
RANK (ng/ml)	0,10 (0,00; 1,11) ⁺	0,74 (0,00; 0,92)	NS ⁺⁺⁺
RANKL (ng/ml)	0,42 (0,06; 3,23)	0,11 (0,08; 0,14)	p=0,01⁺⁺
OPG (pg/ml)	93,01 (43,66; 671,65)	53,95 (28,91; 99,44)	NS

⁺ mediana (wartość minimalna i maksymalna)

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ nieznamienna statystycznie

5.1.4. Grupa I.3. Chorzy na raka prostaty z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa.

Wartości median aktywności wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej u chorych na raka prostaty z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa, n=15 (podgrupa I.3) i w podgrupie II.3, n=5 ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym w prostaty, przed jego operacją, bez obecności przerzutów przedstawia tabela 12. Wartości median MMP2, CD44, tPA, uPA, OPN były wyższe, natomiast wartości MMP9 były niższe w podgrupie I.3 od wartości median stwierdzonych w grupie kontrolnej. W analizie statystycznej wykazał istotną statystycznie różnicę w zakresie mediany MMP9 pomiędzy podgrupą I.2 a podgrupą kontrolną (ryc. 11).

Tabela 12. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka prostaty z przerzutami nowotworowymi i grupie kontrolnej

Wskaźnik	Podgrupa I.3 n=15	Podgrupa II.3 n=5	Analiza statystyczna
MMP9 (ng/ml)	397,86 (72,77; 763,48) ⁺	823,34 (550,30; 1146,01)	p=0,05 ⁺⁺
MMP2 (ng/ml)	242,38 (187,99; 341,98)	195,04 (145,87; 218,65)	NS ⁺⁺⁺
CD44 (ng/ml)	162,78 (74,38; 254,24)	129,08 (122,20; 135,76)	NS
tPA (pg/ml)	5154,70 (3184,78; 9366,73)	3902,56 (2511,61; 4697,11)	NS
uPA (pg/ml)	659,80 (417,94; 1061,94)	587,42 (487,28; 1483,16)	NS
OPN (pg/ml)	32062,62 (0,00; 259355,19)	10440,14 (0,00; 20918,86)	NS

⁺ mediana (wartość minimalna i maksymalna)

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ nieznamienne statystycznie

Tabela 13 przedstawia wartości median aktywności wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka prostaty z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa (podgrupa I.3) i w podgrupie II.3 (kontrolnej) ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym w prostaty, przed jego operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa. Wartości median, RANK, OPG, w podgrupie I.3 były wyższe, a wartości mediany RANKL były niższe od wartości median w podgrupie II.3. Przeprowadzone obliczenia nie wykazały zależności znamiennej statystycznej w zakresie aktywności RANK, RANKL i OPG pomiędzy podgrupami I.3, a podgrupą kontrolną II.3.

Tabela 13. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w grupie chorych na raka prostaty z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i w grupie kontrolnej

Wskaźnik	Podgrupa I.3 n=15	Podgrupa II.3 n=5	Analiza statystyczna
RANK (ng/ml)	0,16 (0,00; 1,10) ⁺	0,00 (0,00; 0,31)	NS ⁺⁺
RANKL (ng/ml)	0,35 (90,05; 2,45)	0,455 (0,18; 0,62)	NS
OPG (pg/ml)	85,06 (29,91; 1746,32)	63,52 (53,35; 113,45)	NS

⁺ mediana (wartość minimalna i maksymalna)

⁺⁺ nieznamienne statystycznie

5.2. Wartości wskaźników kaskady nowotworowej i osteoklastogenezy nowotworowej w poszczególnych grupach badawczych w odniesieniu do danych klinicznych i zastosowanego leczenia

5.2.1. Grupa I, wszyscy analizowani pacjenci, z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym nowotworu

Badania statystyczne dotyczą wartości median wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie I, chorych z przerzutami do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym w odniesieniu do danych uzyskanych z wywiadu chorobowego przedstawia tabela 14. W analizie wpływu obecności przerzutu do kręgosłupa jako pierwszego objawu choroby nowotworowej na aktywność badanych wskaźników średnie wartości median MMP9, CD44, tPA i OPN były podwyższone, a MMP2 i uPA obniżone. W badaniach statystycznych nie stwierdziliśmy istotnych zależności pomiędzy ekspresją wskaźników a obecnością przerzutu do kręgosłupa jako pierwszego objawu choroby nowotworowej. Mediany wszystkich wskaźników, z wyjątkiem MMP2 u chorych, którzy mieli operowane ognisko pierwotne, były niższe w porównaniu z ich aktywnością u chorych, którzy nie mieli leczonego operacyjnie ogniska pierwotnego. Korelacja ta nie była jednak na poziomie istotności statystycznej. Stwierdziliśmy istotną statystycznie korelację w zakresie aktywności uPA, a długości czasu od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu do kręgosłupa (ryc. 12).

Tabela 14. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego

Dane z wywiadu chorobowego	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Przerzut do kręgosłupa pierwszym objawem choroby nowotworowej tak, n=12 (20%) nie, n=49 (80%)	571,65 ⁺ 422,24 p= 0,29 ⁺⁺	214,42 231,52 p= 0,66	166,70 160,80 p= 0,40	6078,59 5297,95 p= 0,52	584,40 663,70 p= 0,33	53655,60 23382,58 p= 0,20
Operacja ogniska pierwotnego tak, n=30 (49%) nie, n=31 (51%)	395,44 434,97 p= 0,94	236,72 220,84 p= 0,75	154,74 160,80 p= 0,33	5337,52 5426,61 p= 0,67	637,96 657,81 p= 0,35	21313,16 31182,29 p= 0,24
Czas od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa	p= 0,14 ⁺⁺⁺	p= 0,45	p= 0,42	p= 0,53	p= 0,04	p= 0,43

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ zależność monotoniczna Spearmana

Korelacja median wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej z wynikami badań klinicznych przedstawia tabela 15. Mediany wszystkich wskaźników biochemicznych były podwyższone (z wyjątkiem CD44), u chorych z zajęciem dwóch i trzech odcinków kręgosłupa, w porównaniu z analizowanymi chorymi, u których przerzut nowotworowy obejmował jeden odcinek kręgosłupa. W przeprowadzonych obliczeniach stwierdziliśmy istotnie statystycznie zależność pomiędzy staniem OPN a rozległości zmian nowotworowych w kręgosłupie (ryc.13).

Mediany MMP2, CD44, uPA, OPN były podwyższone, a MMP9 i tPA obniżone u chorych z obecnością przerzutów w szkieletie kostnym. Zależności na poziomie istotności statystycznej odnotowaliśmy pomiędzy staniem MMP2, CD44 i uPA, a obecnością przerzutów w szkieletie kostnym (ryc. 14, 15 i 16).

U chorych z przerzutami w narządach wewnętrznych były podwyższone wartości median MMP9, tPA, OPN a CD44 były identyczne natomiast MMP2 i uPA były obniżone. Zależności na poziomie istotności statystycznej nie stwierdziliśmy pomiędzy aktywności wskaźników a obecnością przerzutów w narządach wewnętrznych.

W skali Tokuhashi, wraz z zaawansowaniem choroby nowotworowej ulegało podwyższeniu wartości median MMP9 i uPA, wartości pozostałych wskaźników były obniżone. Obliczenia statystyczne nie wykazały istotności pomiędzy analizowanymi wskaźnikami a skalą Tokuhashi. Korelacja median wszystkich analizowanych wskaźników (MMP9, MMP2, CD44, tPA, uPA, OPN) ze skalą De Walda wykazała wysze ich wartości u chorych z objawami immunosupresji, a istotne statystycznie korelacje stwierdziliśmy w zakresie wskaźników CD44, tPA, OPN a stanem immunologicznym chorych (ryc. 17, 18 i 19).

Nie wykazaliśmy korelacji na poziomie istotności statystycznej pomiędzy analizowanymi wskaźnikami kaskady nowotworowej a poziomem wapnia zjonizowanego w surowicy krwi.

W analizowanej grupie chorych wykazaliśmy korelacje istotne statystycznie pomiędzy stanem wskaźników tPA, uPA i OPN a poziomem fosfatazy zasadowej w surowicy krwi (ryc. 20, 21 i 22).

Tabela 15. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym w odniesieniu do wyników badań klinicznych

Dane kliniczne	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Lokalizacja w kręgosłupie jeden odcinek, n=43 (72%) dwa i trzy odcinki, n=17(28%)	371,83 ⁺ 423,62 p= 0,39 ⁺⁺	209,87 239,39 p= 0,08	156,79 134,73 p= 0,19	5189,25 5515,92 p= 0,76	612,16 671,72 p= 0,16	18566,10 28490,10 p= 0,05
Przerzuty w szkieletcie kostnym tak, n=43 (72%) nie, n=17 (28%)	405,79 556,29 p= 0,13 ⁺⁺	234,35 191,11 p= 0,05	164,75 117,48 p= 0,04	5297,95 6352,71 p= 0,81	673,71 485,30 p= 0,003	24986,57 24454,93 p= 0,72
Przerzuty w narządach wewnętrznych tak, n=16 (27%) nie, n=44 (73%)	455,46 397,58 p= 0,54 ⁺⁺	195,02 239,39 p= 0,34	160,80 160,80 p= 0,99	5646,70 5362,28 p= 0,86	491,25 662,78 p= 0,13	20973,78 26302,64 p= 0,75
Skala Tokuhaschi 1 do 8 punktów, n=40 (67%) 9 do 15 punktów, n=20 (33%)	386,94 437,48 p= 0,48 ⁺⁺	227,75 223,37 p= 0,85	160,80 158,80 p= 0,65	5963,52 5139,90 p= 0,38	633,99 688,91 p= 0,50	26303,64 16703,64 p= 0,10
Skala De Walda prawidłowy stan immunologiczny, n=50 (83%) objawy immunosupresji, n=10 (17%)	388,81 699,35 p= 0,14 ⁺⁺	222,41 234,35 p= 0,82	158,80 191,08 p= 0,04	5139,90 9551,76 p= 0,00	646,89 837,05 p= 0,11	21448,22 32440,12 p= 0,03
Ca (mmol/l)	p= 0,70 ⁺⁺⁺	p= 0,89	p= 0,86	p= 0,69	p= 0,84	p= 0,44
Fosfataza zasadowa (U/L)	p= 0,22 ⁺⁺⁺	p= 0,37	p= 0,77	p= 0,01	p= 0,03	p=0,000001

⁺ mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ zależność monotoniczna Spearmana

Aktywność wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w zależności od rodzaju leczenia onkologicznego została przedstawiona w tabeli 16. W odniesieniu do MMP9 i OPN u chorych leczonych chemioterapią, radioterapią, hormonoterapią i bifosfonianami obserwowano niższe wartości median w porównaniu do chorych, u których tego leczenia nie stosowano, a w odniesieniu do aktywności MMP2, uPA wartości median były wyższe. Takiej zależności nie stwierdzono w analizie median pozostałych wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej (CD44, tPA). Obliczenia statystyczne wykazały na poziomie istotności w zastosowaniu radioterapii na stadium MMP9, MMP2 i OPN (ryc. 23, 24 i 25) oraz zastosowania bifosfonianów na stadium tPA, OPN (ryc. 26 i 27).

Tabela 16. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym w odniesieniu do leczenia onkologicznego

Leczenie onkologiczne	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44(ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Chemioterapia tak, n=33 (54%) nie, n=28 (46%)	368,63 ⁺ 478,68 p= 0,21 ⁺⁺	246,00 212,54 p= 0,14	160,80 160,80 p= 0,99	5654,73 5159,63 p= 0,85	663,77 645,90 p= 0,64	23651,86 28470,10 p= 0,50
Radioterapia tak, n=33 (54%) nie, n=28 (46%)	354,86 678,50 p= 0,004⁺⁺	248,53 212,54 p= 0,013	160,80 154,70 p= 0,43	5120,16 5963,52 p= 0,21	683,64 597,28 p= 0,09	18656,10 31308,44 p= 0,04
Hormonoterapia tak, n=18 (29%) nie, n=43 (71%)	360,15 423,89 p= 0,41 ⁺⁺	253,75 216,14 p= 0,18	170,58 156,79 p= 0,28	5291,12 5377,10 p= 0,24	677,68 620,10 p= 0,13	18655,41 31434,59 p= 0,14
Bisfosfoniany tak, n=21 (34%) nie, n=40 (66%)	365,33 464,34 p= 0,14 ⁺⁺	231,52 218,49 p= 0,24	172,51 148,59 p= 0,02	4903,41 6287,68 p= 0,05	673,71 638,96 p= 0,15	13832,68 31308,44 p= 0,03

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

Tabela 17 przedstawia wartości median aktywności wskaźników kaskady nowotworowej w odniesieniu do wyników leczenia. Mediana MMP9 i OPN były niższe u chorych z dobrym wynikiem leczenia w porównaniu z grupą chorych ze złym wynikiem leczenia. Wartości median pozostałych wskaźników (MMP2, CD44, tPA i uPA) były wyższe u chorych, u których odnotowano dobry wynik leczenia. W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdziliśmy istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stężeniem MMP9 i OPN a wynikiem leczenia.

Tabela 17. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym w odniesieniu do wyników leczenia.

Wyniki leczenia	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Poprawa lub stabilizacja, n=25 (51%)	368,63 p=0,14 ⁺⁺	246,00 p=0,04	168,66 p=0,10	5714,34 p=0,93	673,71 p=0,52	19513,85 p=0,77
Pogorszenie lub zgon, n=24 (49%)	498,49 ⁺	206,27	156,76	5228,79	639,94	25645,10

⁺ mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

Badania statystyczne dotyczą wartości median wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w grupie I chorych, z przerzutami do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym, w odniesieniu do danych uzyskanych z wywiadu chorobowego przedstawia tabela 18. W badaniu wpływu obecności przerzutu do kręgosłupa

jako pierwszego objawu choroby nowotworowej na aktywność wskaźników tylko mediana OPG była podwyższona, ale nie stwierdziliśmy istotnych statystycznie zależności. Mediana wskaźników RANKL i OPG u chorych, którzy mieli operowane ognisko pierwotne była niższa w porównaniu z ich aktywnością u chorych, którzy nie mieli leczonego operacyjnie ogniska pierwotnego. Korelacje te również nie wykazały istotności statystycznej. Stwierdziliśmy istotną statystycznie korelację w zakresie aktywności OPG, a długości czasu od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu do kręgosłupa (ryc. 28).

Tabela 18. Mediana wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w grupie chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego

Dane z wywiadu chorobowego	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Przerzut do kręgosłupa pierwszym objawem choroby nowotworowej tak, n=12 (20%) nie, n=49 (80%)	0,11 ⁺ 0,20 p= 0,98 ⁺⁺	0,27 0,33 p= 0,99	100,84 96,52 p= 0,78
Operacja ogniska pierwotnego tak, n=30 (49%) nie, n=31 (51%)	0,185 0,12 p= 0,70 ⁺⁺	0,195 0,40 p= 0,49	91,25 100,61 p= 0,32
Czas od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa	p= 0,63 ⁺⁺⁺	p= 0,49	p= 0,003

⁺mediana

⁺⁺test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺zależność monotoniczna Spearmana

Korelację wartości median wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej z wynikami badań klinicznych przedstawia tabela 19. Mediana RANK była podwyższona, u chorych z zajęciem dwóch i trzech odcinków kręgosłupa, w porównaniu z grupą chorych, u których przerzut nowotworowy obejmował jeden odcinek kręgosłupa.

W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem RANK, a rozległości zmian w kręgosłupie.

Mediana RANK, RANKL była podwyższona u chorych z obecnością przerzutów w szkieletie kostnym, ale nie odnotowaliśmy zależności na poziomie istotności statystycznej pomiędzy stężeniem RANK i RANKL a obecnością przerzutów w innych miejscach szkieletu kostnego.

U chorych z obecnością przerzutów w narządach wewnętrznych była podwyższona wartość median RANKL i OPG. Nie wykazaliśmy zależności na poziomie istotności statystycznej pomiędzy RANKL i OPG a obecnością przerzutów w narządach wewnętrznych.

W skali Tokuhashi, wraz z zaawansowaniem choroby nowotworowej, ulega podwyższeniu wartość median RANK i RANKL, a mediana OPG była obniżona. Przeprowadzone obliczenia statystyczne nie wykazały istotnych zależności pomiędzy RANK, RANKL, OPG a stopniem zaawansowania choroby nowotworowej w skali Tokuhashi.

Korelacja median wszystkich analizowanych wskaźników osteoklastogenezy nowotworowej ze skalą De Walda wykazała wyższe ich wartości u chorych z objawami immunosupresji, a istotne statystycznie korelacje stwierdziliśmy w zakresie wskaźnika RANKL a stanem immunologicznym chorych (ryc. 29).

Wykazaliśmy korelacje istotne statystycznie pomiędzy stopniem wskaźników RANK i OPG a poziomem aktywności fosfatazy zasadowej w surowicy krwi (ryc. 30 i 31).

Tabela 19. Wartości median wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w grupie chorych z przerzutami nowotworowym do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym w odniesieniu do wyników badań klinicznych

Dane kliniczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Lokalizacja w kręgosłupie jeden odcinek, n=43 (72%) dwa i trzy odcinki, n=17 (28%)	0,12 ⁺ 0,185 p= 0,56 ⁺⁺	0,35 0,23 p= 0,26	97,10 96,225 p= 0,74
Przerzuty w szkieletcie kostnym tak, n=43 (72%) nie, n=17 (28%)	0,21 0,10 p= 0,66 ⁺⁺	0,40 0,19 p= 0,60 ⁺	95,93 105,28 p= 0,57
Przerzuty w narządach wewnętrznych tak, n=16 (27%) nie, n=44 (73%)	0,105 0,23 p= 0,65 ⁺⁺	0,23 0,40 p= 0,37	95,17 101,2 p= 0,65
Skala Tokuhashi 1 do 8 punktów, n=40 (67%) 9 do 15 punktów, n=20 (33%)	0,16 0,28 p= 0,89 ⁺⁺	0,285 0,35 p= 0,65	99,12 88,02 p= 0,23
Skala De Walda prawidłowy stan immunologiczny, n=50 (85%) objawy immunosupresji, n=9 (15%)	0,12 0,48 p= 0,55 ⁺⁺	0,24 0,47 p= 0,04	92,715 120,44 p= 0,14
Ca (mml)	p= 0,30 ⁺⁺⁺	p= 0,53	p= 0,53
Fosfataza zasadowa (U/L)	p= 0,00002 ⁺⁺⁺	p= 0,72	p= 0,009

⁺mediana

⁺⁺test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺zależność monotoniczna Spearmana

W badaniach statystycznych dotyczących wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej stwierdziliśmy niższe mediany aktywności OPG u chorych leczonych chemioterapią, radioterapią, hormonoterapią i bifosfonianami w porównaniu do

chorych, u których tego leczenia nie stosowano (tabela 20). Takiej zależności nie stwierdziliśmy w odniesieniu do ekspresji RANK i RANKL. W badaniach statystycznych nie stwierdziliśmy istotnych zależności pomiędzy aktywności wskaźników osteoklastogenezy nowotworowej a zastosowanym leczeniem onkologicznym.

Tabela 20. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w grupie chorych z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym w odniesieniu do leczenia onkologicznego

Leczenie onkologiczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Chemioterapia tak, n=33 (54%) nie, n=28 (46%)	0,22 ⁺ 0,11 p= 0,98 ⁺⁺	0,20 0,41 p= 0,3	92,42 100,61 p= 0,34
Radioterapia tak, n=33 (54%) nie, n=28 (46%)	0,20 0,12 p= 0,85 ⁺⁺	0,40 0,28 p= 0,08	95,93 97,08 p= 0,83
Hormonoterapia tak, n=18 (29%) nie, n=43 (71%)	0,05 0,21 p= 0,19 ⁺⁺	0,16 0,40 p= 0,06	92,425 97,64 p= 0,53
Bisfosfoniary tak, n=21 (33%) nie, n=40 (67%)	0,17 0,16 p= 0,50 ⁺⁺	0,40 0,23 p= 0,33	84,21 101,20 p= 0,11

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

Tabela 21 przedstawia wartości median aktywności wskaźników w odniesieniu do wyników leczenia. Mediany RANK, RANKL i OPG były niższe u chorych z dobrym wynikiem leczenia w porównaniu z grupą chorych ze złym wynikiem leczenia. W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdziliśmy istotnych statystycznie różnic pomiędzy stężeniem RANK, RANKL i OPG a wynikiem leczenia.

Tabela 21. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w grupie chorych z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym w odniesieniu do wyników leczenia

Wyniki leczenia	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Poprawa lub stabilizacja, n=25 (51%)	0,1 p=0,59 ⁺⁺	0,19 p=0,1	96,52 p=0,61
Pogorszenie lub zgon, n=24 (49%)	0,17 ⁺	0,375	96,785

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

5.2.2. Podgrupa I.1. Chorzy na raka nerki z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa.

Badania statystyczne dotyczą wartości median wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego przedstawia tabela 22. W analizie wpływu obecności przerzutu do kręgosłupa jako pierwszego objawu choroby nowotworowej na poziom aktywności badanych wskaźników stwierdziliśmy podwyższone wartości median MMP9, tPA, OPN, ale w obliczeniach statystycznych nie stwierdziliśmy istotnych zależności pomiędzy ich ekspresją, a obecnością przerzutu nowotworowego do kręgosłupa jako pierwszego objawu choroby nowotworowej. Mediany powyższych wskaźników, to jest MMP9, tPA, OPN u chorych, którzy mieli operowane ognisko pierwotne, były niższe w porównaniu z ich aktywnością u chorych, którzy nie mieli leczonego operacyjnie ogniska pierwotnego. Zależność ta również nie była na poziomie istotności statystycznej. Stwierdziliśmy istotne statystycznie korelacje pomiędzy aktywnością MMP9, uPA a długością czasu od wystąpienia objawów przerzutu do kręgosłupa (ryc. 32, 33).

Tabela 22. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego

Dane z wywiadu chorobowego	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Przerzut do kręgosłupa pierwszym objawem choroby nowotworowej tak, n=3 (20%) nie, n=12 (80%)	699,35 ⁺ 359,64 p= 0,07 ⁺⁺	216,14 243,96 p= 0,71	148,59 160,77 p= 0,77	13088,16 5100,68 p= 0,12	620,10 637,96 p= 0,82	26303,64 23783,70 p= 0,51
Operacja ogniska pierwotnego tak, n=12 (80%) nie, n=3 (20%)	359,64 699,35 p= 0,07 ⁺⁺	243,96 216,96 p= 0,71	160,77 148,59 p= 0,77	5100,68 13088,16 p= 0,12	637,96 620,10 p= 0,82	23783,70 26303,64 p= 0,51
Czas od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa	p= 0,01 ⁺⁺⁺	p= 0,42	p= 0,42	p= 0,89	p= 0,02	p= 0,61

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ zależność monotoniczna Spearmana

Zależności pomiędzy wskaźnikami biochemicznymi kaskady nowotworowej z objawami choroby i wynikami badań klinicznych przedstawia tabela 23. Mediany wskaźników biochemicznych MMP9, MMP2 i OPN były podwyższone u chorych z zajęciem dwóch i trzech odcinków kręgosłupa, w porównaniu z grupą chorych, u których przerzut nowotworowy obejmował jeden odcinek kręgosłupa. W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy stężeniem wyżej wymienionych wskaźników, a rozległości zmian w kręgosłupie.

U chorych z obecnością przerzutów w innych miejscach szkieletu kostnego występowały wyższe wartości median w zakresie CD44 i OPN, ale przeprowadzone badania nie wykazały zależności na poziomie istotności statystycznej.

Podwyższone wartości median MMP9, MMP2, OPN odnotowaliśmy w przypadku obecności przerzutów nowotworowych do narządów wewnętrznych. Istotnych statystycznie zależności nie wykazaliśmy pomiędzy ich stężeniem a obecnością przerzutów w narządach wewnętrznych.

W odniesieniu do skali Tokuhashi tylko wartość mediany MMP2 nie korelowała z zaawansowaniem choroby nowotworowej (nie była podwyższona wraz z zaawansowaniem choroby nowotworowej). W przeprowadzonych badaniach nie uzyskaliśmy istotnej statystycznie różnicy pomiędzy aktywnością wskaźników biochemicznych a zaawansowaniem choroby nowotworowej w skali Tokuhashi.

Korelacja wartości median wszystkich analizowanych wskaźników ze skalą De Walda wykazała wyższe ich wartości u chorych z objawami immunosupresji, ale istotnych statystycznie zależności nie stwierdziliśmy.

W analizowanej grupie chorych obliczenia statystyczne wykazały korelację na poziomie istotności statystycznej pomiędzy aktywnością fosfatazy zasadowej a stężeniem OPN (ryc. 34).

Tabela 23. Wartości median wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do objawów choroby i wyników badań klinicznych

Dane kliniczne	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Lokalizacja w kręgosłupie jeden odcinek, n=8 (53%) dwa i trzy odcinki, n=7(47%)	359,64 ⁺ 423,34 p= 0,86 ++	213,04 246,00 p= 0,16	166,70 144,38 p= 0,44	6553,17 5297,95 p= 0,95	683,64 592,32 p= 0,04	20884,29 26303,64 p= 0,48
Przerzuty w szkieletcie kostnym tak, n=10 (67%) nie, n=5 (33%)	376,52 688,89 p= 0,12 ++	243,96 193,92 p= 0,14	158,62 156,79 p= 0,62	6076,20 6442,84 p= 0,35	616,13 693,58 p= 0,66	24708,06 24454,93 p= 0,95
Przerzuty w narządach wewnętrznych tak, n=2 (13%) nie, n=13 (87%)	664,54 368,63 p= 0,35 ++	247,26 231,52 p= 0,49	130,93 164,75 p= 0,34	2438,28 6663,5 p= 0,05	410,98 663,77 p= 0,14	81244,30 23112,48 p= 0,34
Skala Tokuhashi 1 do 8 punktów, n=11 (73%) 9 do 15 punktów, n=4 (27%)	422,24 528,76 p= 0,39 ++	246,00 192,52 p= 0,07	148,59 160,77 p= 1,00	5297,95 6553,17 p= 0,74	612,16 714,47 p= 0,26	24454,93 32841,14 p= 0,94
Skala De Walda prawidłowy stan immunologiczny, n=13 (87%) objawy immunosupresji, n=2 (13%)	422,24 508,88 p= 0,93 ++	241,91 243,50 p= 0,44	159,79 199,86 p= 0,34	6442,84 8374,89 p= 0,93	612,16 646,90 p= 0,67	24454,93 107253,68 p= 0,34
Ca (mmol/l)	p= 0,71 ⁺⁺⁺	p= 0,42	p= 0,37	p= 0,24	p= 0,54	p= 0,34
Fosfataza zasadowa (U/L)	p= 0,48 +++	p= 0,50	p= 0,50	p= 0,30	p= 0,71	p= 0,0006

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ zależność monotoniczna Spearmana

Związek aktywności wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w zależności od rodzaju leczenia onkologicznego został przedstawiony w tabeli 24. W odniesieniu do MMP9 i tPA u chorych leczonych chemioterapią, radioterapią, bifosfonianami obserwowano niższe wartości median w porównaniu do chorych, u których tego leczenia nie zastosowano. Takiej zależności nie stwierdzono w analizie median pozostałych wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej (MMP2, CD 44, uPA, OPN). Obliczenia wykazały istotne statystycznie zależności pomiędzy zastosowaniem radioterapii i bifosfonianów a stężeniem MMP9 (ryc. 35, 36) i zastosowaniem bifosfonianów a stężeniem tPA (ryc. 37).

Tabela 24. Wartości median wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do leczenia onkologicznego

Leczenie onkologiczne	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Chemioterapia tak, n=10 (67%) nie, n=5 (33%)	395,44 ⁺ 674,62 p= 0,85 ⁺⁺	246,00 216,14 p= 0,35	150,58 168,66 p= 0,26	5980,72 6442,84 p= 0,66	605,34 673,71 p= 0,35	28822,82 23122,48 p= 0,80
Radioterapia tak, n=10 (67%) nie, n=5 (33%)	340,73 699,35 p= 0,01⁺⁺	238,76 241,91 p= 0,90	160,77 148,59 p= 0,80	5783,46 6442,84 p= 0,58	637,96 620,10 p= 0,58	20884,29 26303,64 p= 0,35
Hormonoterapia	⁺⁺⁺ _____	_____	_____	_____	_____	_____
Bisfosfoniary tak, n=4 (27%) nie, n=11 (73%)	290,16 674,62 p= 0,03⁺⁺	216,00 246,00 p= 0,55	169,53 156,79 p= 0,64	4201,45 6824,28 p= 0,04	633,02 620,10 p= 0,74	26303,64 11556,24 p= 0,32

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ nie było zastosowana hormonoterapia

Tabela 25 przedstawia wartości median aktywności wskaźników w odniesieniu do wyników leczenia. Mediana OPN była niższa u chorych z dobrym wynikiem leczenia w porównaniu z grupą chorych ze złym wynikiem leczenia. Wartości median pozostałych wskaźników (MMP9, MMP2, CD44, tPA i uPA) były wyższe u chorych, u których odnotowano dobry wynik leczenia. W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stężeniem OPN a wynikiem leczenia.

Tabela 25. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do wyników leczenia

Wyniki leczenia	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Poprawa lub stabilizacja n=9 (75%)	688,89 ⁺ p=0,45 ⁺⁺	246 p=1,00	164,75 p=0,45	6663,50 p=0,19	620,10 p=0,45	18656,10 p=0,92
Pogorszenie lub zgon n=3 (25%)	422,24	241,91	144,38	4903,41	592,32	42516,88

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

Badania statystyczne dotyczące wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej wykazały niższe wartości median RANK, RANKL i OPG u chorych, u których przerzut do kręgosłupa był pierwszym objawem choroby nowotworowej, ale zależności na poziomie istotności statystycznej nie wykazano (tabela

26). U wszystkich chorych, u których było operowane ognisko pierwotne, stwierdziliśmy wartość median RANK, RANKL i OPG, ale te zależności na poziomie istotności statystycznej nie wykazały.

Odnotowaliśmy zależność na poziomie istotności statystycznej pomiędzy stężeniem RANKL a czasem od wystąpienia objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa (ryc. 38).

Tabela 26. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego

Dane z wywiadu chorobowego	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Przerzut do kręgosłupa pierwszym objawem choroby nowotworowej tak, n=3 (20%) nie, n=12 (80%)	0,12 ⁺ 0,49 p= 0,51 ⁺⁺	0,17 0,29 p= 0,46	77,74 101,20 p= 0,51
Operacja ogniska pierwotnego tak, n=12 (80%) nie, n=3 (20%)	0,49 0,12 p= 0,51 ⁺⁺	0,29 0,17 p= 0,46	101,20 77,74 p= 0,51
Czas od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa	p= 0,86 ⁺⁺⁺	p= 0,005	p= 0,42

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ zależność monotoniczna Spearmana

Korelacja wartości median wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej z wynikami badań klinicznych przedstawia tabela 27. Mediana OPG była podwyższona u chorych z zajęciem dwóch i trzech odcinków kręgosłupa, w porównaniu z grupą chorych, u których przerzut nowotworowy obejmował jeden odcinek kręgosłupa. Przeprowadzone obliczenia nie wykazały istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem OPG a rozległością zmian w kręgosłupie.

Mediana RANKL była podwyższona u chorych z obecnością przerzutów w szkieletie kostnym, ale nie odnotowaliśmy zależności na poziomie istotności statystycznej pomiędzy stężeniem RANKL a obecnością przerzutów w innych częściach szkieletu kostnego.

U chorych z obecnością przerzutów w narządach wewnętrznych były podwyższone mediany RANK i OPG. Nie wykazałyśmy zależności na poziomie istotności statystycznej pomiędzy RANK i OPG, a obecnością przerzutów w narządach wewnętrznych.

W skali Tokuhaschi, wraz z zaawansowaniem choroby nowotworowej, ulegała podwyższeniu wartość median RANK i OPG. Przeprowadzone obliczenia statystyczne nie

wykazał istotnych zależności pomiędzy RANK i OPG a stopniem zaawansowania choroby nowotworowej w skali Tokuhashi.

Korelacja median RANK i RANKL ze skalą De Walda wykazała wysze ich wartości u chorych z objawami immunosupresji, ale nie stwierdziliśmy korelacji na poziomie istotności statystycznych pomiędzy ich ekspresją a stanem immunologicznym chorych.

Korelację na poziomie istotności statystycznej wykazaliśmy pomiędzy aktywnością fosfatazy zasadowej a stopniem RANK (ryc. 39).

Tabela 27. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do objawów choroby i wyników badań klinicznych

Dane kliniczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Lokalizacja w kręgosłupie jeden odcinek, n=8 (53%) dwa i trzy odcinki, n=7 (47%)	0,53 ⁺ 0,02 p= 0,68 ⁺⁺	0,30 0,17 p= 0,29	98,85 101,78 p= 0,45
Przerzuty w szkieletcie kostnym tak, n=10 (67%) nie, n=5 (33%)	0,37 0,57 p= 0,95 ⁺⁺	0,40 0,19 p= 0,50	92,41 108,20 p= 0,42
Przerzuty w narządach wewnętrznych tak, n=2 (20%) nie, n=13 (80%)	0,54 0,49 p= 0,67 ⁺⁺	0,10 0,40 p= 0,10	107,28 100,61 p= 0,67
Skala Tokuhashi 1 do 8 punktów, n=11 (73%) 9 do 15 punktów, n=4 (27%)	0,26 0,62 p= 0,55 ⁺⁺	0,40 0,19 p= 0,95	100,61 102,65 p= 0,84
Skala De Walda prawidłowy stan immunologiczny, n=13 (80%) objawy immunosupresji, n=2 (20%)	0,26 0,70 p= 0,15 ⁺⁺	0,19 0,32 p= 0,86	100,61 99,09 p= 0,93
Ca (mmol)	p= 0,65 ⁺⁺⁺	p= 0,41	p= 0,70
Fosfataza zasadowa (U/L)	p= 0,04⁺⁺⁺	p= 0,67	p= 0,63

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ zależność monotoniczna Spearmana

W badaniach statystycznych dotyczących wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej stwierdziliśmy nisze wartości median OPG u chorych leczonych chemioterapią, radioterapią i bifosfonianami w porównaniu do chorych, u których tego leczenia nie zastosowano (tabela 28). W tej analizie nie stwierdziliśmy istotnych statystycznie korelacji pomiędzy OPG a zastosowanym leczeniem onkologicznym.

Tabela 28. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do leczenia onkologicznego

Leczenie onkologiczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Chemioterapia tak, n=10 (67%) nie, n=5 (33%)	0,49 + 0,12 p= 0,50 ++	0,19 0,41 p= 0,71	99,44 100,61 p= 0,85
Radioterapia tak, n=10 (67%) nie, n=5 (33%)	0,53 0,12 p= 0,30 ++	0,40 0,10 p= 0,03	98,855 123,94 p= 0,50
Hormonoterapia	+++ —————	—————	—————
Bisfosfoniary tak, n=4 (27%) nie, n=11 (73%)	0,36 0,49 p= 0,95 ++	0,47 0,19 p= 0,13	92,41 102,78 p= 0,74

+ mediana

++ test Manna-Whitneya

+++ Nie była zastosowana hormonoterapia

Tabela 29 przedstawia wartości median aktywności wskaźników w odniesieniu do wyników leczenia. Mediany RANK, RANKL i OPG były wyższe u chorych z dobrym wynikiem leczenia w porównaniu z grupą chorych ze złym wynikiem leczenia. W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdziliśmy istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stężeniem RANK, RANKL, OPG a wynikiem leczenia.

Tabela 29. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka nerki z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do objawów choroby i wyników badań klinicznych

Wyniki leczenia	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Poprawa lub stabilizacja, n=9 (75%)	0,5 p=1,0++	0,19 p=0,78	100,61 p=1,00
Pogorszenie lub zgon, n=3 (25%)	0,49+	0,17	84,21

+ mediana

++ test Manna-Whitneya

5.2.3. Podgrupa I.2. Chore na raka piersi z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa.

Badania statystyczne dotyczące wartości median wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka piersi z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa, w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego, przedstawia tabela 30.

Tabela 30. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka piersi z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego

Dane z wywiadu chorobowego	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Przerzut do kręgosłupa pierwszym objawem choroby nowotworowej tak, n=2 (13%) nie, n=13 (87%)	263,46 ⁺ 359,86 p= 0,93 ⁺⁺	229,08 257,38 p= 0,80	437,68 183,78 p= 0,67	5943,29 5159,63 p= 0,80	650,20 819,08 p= 0,27	105780,35 18367,48 p= 0,05
Operacja ogniska pierwotnego tak, n=9 (60%) nie, n=6 (40%)	436,89 417,06 p= 0,95 ⁺⁺	257,38 243,29 p= 0,95	152,72 267,63 p= 0,11	5159,63 5943,29 p= 0,68	819,08 730,50 p= 0,95	18367,48 45195,92 p= 0,24
Czas od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa	p= 0,10 ⁺⁺⁺	p= 0,25	p= 0,68	p= 0,92	p= 0,32	p= 0,73

⁺mediana

⁺⁺test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺zależność monotoniczna Spearmana

W analizie wpływu obecności przerzutu do kręgosłupa jako pierwszego objawu choroby nowotworowej na poziom aktywności badanych wskaźników stwierdziliśmy podwyższone wartości median CD44, OPN. W obliczeniach statystycznych wykazaliśmy istotną zależność pomiędzy stężeniem OPN a obecnością przerzutu do kręgosłupa jako pierwszego objawu choroby nowotworowej (ryc. 40). Mediany wskaźników CD44, tPA i OPN u chorych, którzy mieli operowane ognisko pierwotne były niższe w porównaniu z ich aktywnością u chorych, którzy nie mieli leczonego operacyjnie ogniska pierwotnego, ale uzyskane wyniki nie wykazywały korelacji na poziomie istotności statystycznej. Korelacje wartości median wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej z objawami choroby i wynikami badań klinicznych przedstawia tabela 31. Mediany wszystkich wskaźników biochemicznych (z wyjątkiem MMP9) były podwyższone u chorych z zajęciem dwóch i trzech odcinków kręgosłupa w porównaniu z grupą chorych, u których przerzut nowotworowy obejmował jeden odcinek. W przeprowadzonych obliczeniach stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy stężeniem uPA a rozległością zmian w kręgosłupie (ryc. 41).

W odniesieniu do obecności przerzutów w innych częściach szkieletu kostnego stwierdzono również wyższe wartości median wszystkich analizowanych wskaźników, oprócz MMP9. Nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie zależności pomiędzy aktywnością wskaźników a obecnością przerzutów w innych częściach szkieletu kostnego.

Podwyższone wartości median CD44, tPA, uPA odnotowaliśmy w przypadku obecności przerzutów nowotworowych do narządów wewnętrznych. W badaniu korelacji nie wykazaliśmy istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem badanych wskaźników

a obecno ci przerzutów w narz dach wewn trznych.

W odniesieniu do skali Tokuhashi tylko warto mediany MMP2 była podwyższona u pacjentek z zaawansowan chorob nowotworow . Warto ci median pozostałych wska ników były obni one i nie korelowały z zaawansowaniem choroby nowotworowej.

Korelacja warto ci median wszystkich analizowanych wska ników ze skal De Walda wykazała wysze ich warto ci u chorych z objawami immunosupresji i stwierdziłm istotne statystycznie korelacje pomi dzy aktywno ci tPA i uPA a stanem immunologicznym pacjentek ocenionym w skali De Walda (ryc. 42, 43).

W analizowanej grupie chorych obliczenia statystyczne wykazały korelacji na poziomie istotno ci statystycznej pomi dzy poziomem wapnia zjonizowanego a aktywno ci MMP2 (ryc. 44).

Tabela 31. Mediany wska ników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka piersi z przerzutem nowotworowym do kr gosłupa w odniesieniu do objawów choroby i wyników bada klinicznych

Dane kliniczne	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/m)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Lokalizacja w kr gosłapie jeden odcinek, n=7 (47%) dwa i trzy odcinki, n=8 (53%)	556,29 ⁺ 151,51 p= 0,06 ⁺⁺	166,46 278,48 p= 0,12	152,72 214,58 p= 0,10	4972,31 5963,70 p= 0,38	612,16 826,07 p= 0,04	11534,37 21582,86 p= 0,16
Przerzuty w szkieletcie kostnym tak, n=10 (67%) nie, n=5 (33%)	204,20 556,29 p= 0,30 ⁺⁺	263,08 166,46 p= 0,30	185,62 172,51 p= 0,54	826,07 612,16 p= 0,67	826,07 612,18 p= 0,06	19228,6 8291,00 p= 0,33
Przerzuty w narz dach wewn trznych tak, n=3 (20%) nie, n=12 (80%)	132,39 316,34 p= 0,35 ⁺⁺	254,85 263,08 p= 0,72	366,02 162,52 p= 0,11	10646,13 5065,97 p= 0,52	819,08 786,18 p= 0,43	17492,83 19228,60 p= 1,00
Skala Tokuhashi 1 do 8 punktów, n=9 (60%) 9 do 15 punktów, n=6 (40%)	249,10 642,36 p= 0,17 ⁺⁺	257,38 220,96 p= 0,60	183,78 178,14 p= 1,00	5654,73 5065,97 p= 0,44	815,09 756,47 p= 0,96	23651,86 9912,68 p= 0,03
Skala De Walda prawidłowy stan immunologiczny, n=13 (87%) objawy immunosupresji, n=2 (13%)	277,83 406,0 p= 0,67 ⁺⁺	257,38 461,15 p= 0,44	172,51 278,02 p= 0,20	4972,31 20790,14 p= 0,03	757,26 1780,78 p= 0,03	18367,48 77986,11 p= 0,10
Ca (mml)	p= 0,27 ⁺⁺⁺	p= 0,05	p= 0,11	p= 0,67	p= 0,40	p= 0,89
Fosfataza zasadowa (U/L)	p= 0,84 ⁺⁺⁺	p= 0,74	p= 0,15	p= 0,29	p= 0,17	p= 0,09

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ zale no monotoniczna Spearmana

Poziom aktywność wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w zależności od rodzaju leczenia onkologicznego przedstawiony jest w tabeli 32. W odniesieniu do tPA i OPN u chorych leczonych chemioterapią, radioterapią, hormonoterapią i bisfosfonianami obserwowano niższe wartości median w porównaniu do chorych, u których tego leczenia nie zastosowano. Takiej zależności nie stwierdzono w analizie median pozostałych wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej (MMP9, MMP2, CD44, uPA). Obliczenia statystyczne nie wykazały istotnej różnicy pomiędzy ekspresją tPA i OPN a leczeniem onkologicznym.

Tabela 32. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka piersi z przerzutami nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do leczenia onkologicznego

Leczenie onkologiczne	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	VEGF165 (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Chemioterapia tak, n=12 (80%) nie, n=3 (20%)	243,0 ⁺ 741,83 p= 0,17 ⁺⁺	272,12 144,31 p= 0,04	183,78 102,60 p= 0,35	4415,56 8027,78 p= 0,17	817,08 582,41 p= 0,43	0,00 0,00 p= 0,74	17930,16 30676,55 p= 0,07
Radioterapia tak, n=11 (73%) nie, n=4 (27%)	236,85 735,15 p= 0,10 ⁺⁺	275,45 775,38 p= 0,01	183,78 145,02 p= 0,74	4972,31 6593,70 p= 0,65	819,08 597,28 p= 0,21	0,00 0,00 p= 0,65	18367,48 27029,56 p= 0,47
Hormonoterapia tak, n=12 (80%) nie, n=3 (20%)	301,98 277,83 p= 0,61 ⁺⁺	263,08 166,46 p= 0,72	178,14 347,81 p= 0,43	5065,97 8027,28 p= 0,52	817,19 612,16 p= 0,61	0,00 0,00 p= 0,74	18655,41 126295,67 p= 0,43
Bisfosfoniany tak, n=9 (60%) nie, n=6 (40%)	556,29 198,09 p= 0,26 ⁺⁺	257,38 232,13 p= 0,68	241,71 125,60 p= 0,05	4972,31 5407,18 p= 0,77	819,08 725,42 p= 0,26	0,00 0,00 p= 0,50	18367,48 21448,22 p= 0,81

⁺mediana

⁺⁺test Manna-Whitneya

Obserwowano całkowite zahamowanie produkcji VEGF165 w grupie chorych na raka piersi (Tabela 32). VEGF jako silny stymulator angiogenezy wykazuje również związek z kontrolnymi czynnikami uczestniczącymi w krzepnięciu. Z tego powodu podjęto analizę korelacji VEGF i wyników badania układu krzepnięcia. Stwierdzono tendencję ($P = 0,0649$) ku obniżeniu INR (1,07; 0,78-2,55, mediana; minimum-maksimum) u chorych z zahamowaniem produkcji VEGF165 w porównaniu z osobami, u których jest ona utrzymana (1,38; 1,35-1,41, mediana; minimum-maksimum). Podobnie liczba płytek krwi u chorych z wyczerpaniem wytwarzania VEGF165 wykazuje tendencję ($P = 0,0982$) do obniżenia (228,5; 36,8 - 469,0 G/L) w porównaniu do chorych z zachowaniem jego produkcji (270,0; 248,0-493,0 G/L).

Tabela 33 przedstawia wartości median aktywności wskaźników w odniesieniu do wyników leczenia. Mediany MMP9 i OPN były niższe u chorych z dobrym wynikiem leczenia w porównaniu z grupą chorych ze złym wynikiem leczenia. Wartości median pozostałych wskaźników (MMP2, CD44, tPA i uPA) były wyższe u chorych, u których odnotowano dobry wynik leczenia. W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdziliśmy istotnej statystycznej różnicy pomiędzy stężeniem MMP9 i OPN a wynikiem leczenia.

Tabela 33. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka piersi z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do wyników leczenia

Wyniki leczenia	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Poprawa lub stabilizacja n=8 (58%)	263,46 p=0,74 ⁺⁺	261,81 p=0,6	214,58 p=0,40	5963,7 p=0,40	817,08 p=0,65	18218,08 p=0,19
Pogorszenie lub zgon n=6 (42%)	455,57 ⁺	226,43	162,61	4083,54	669,74	59715,29

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

W badaniach statystycznych dotyczących wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej, w zakresie aktywności RANK, RANKL i OPG, w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego, stwierdziliśmy podwyższenia mediany poziomu wszystkich wskaźników u chorych, u których przerzut do kręgosłupa był pierwszym objawem choroby nowotworowej. Nie odnotowaliśmy zależności na poziomie istotności statystycznej pomiędzy RANK, RANKL i OPG, w odniesieniu do obecności przerzutu nowotworowego do kręgosłupa jako pierwszego objawu choroby nowotworowej (tabela 34). U wszystkich chorych, u których było operowane ognisko pierwotne, stwierdziliśmy niższe wartości median RANK, RANKL i OPG, ale te nie wykazały zależności na poziomie istotności statystycznej.

Również pomiędzy stężeniem wskaźników a czasem od wystąpienia objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa nie odnotowaliśmy zależności na poziomie istotności statystycznej.

Tabela 34. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka piersi z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego

Dane z wywiadu chorobowego	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Przerzut do kręgosłupa pierwszym objawem choroby nowotworowej tak, n=2 (13%) nie, n=13 (87%)	0,505 ⁺ 0,10 p= 0,38 ⁺⁺	0,57 0,20 p= 0,35	149,00 91,84 p= 0,15
Operacja ogniska pierwotnego tak, n=9 (60%) nie, n=6 (40%)	0,10 0,335 p= 0,71 ⁺⁺	0,18 0,705 p= 0,06	85,38 122,76 p= 0,14
Czas od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa	p= 0,89 ⁺⁺⁺	p= 0,06	p= 0,14

⁺ mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ zależność monotoniczna Spearmana

Korelację median wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej z wynikami badań klinicznych przedstawia tabela 35. Mediana RANK i OPG była podwyższona u chorych z zajęciem dwóch i trzech odcinków kręgosłupa, w porównaniu z grupą chorych, u których przerzut nowotworowy obejmował jeden odcinek kręgosłupa. W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdziliśmy istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem RANK i OPG a rozległości zmian w kręgosłupie. Mediana RANK była podwyższona u chorych z obecnością przerzutów w szkieletie kostnym, ale nie odnotowaliśmy zależności na poziomie istotności statystycznej pomiędzy stężeniem RANK a obecnością przerzutów w innych miejscach szkieletu kostnego.

U chorych z obecnością przerzutów w narządach wewnętrznych była podwyższona wartość median RANK i RANKL. Nie wykazaliśmy zależności na poziomie istotności statystycznej pomiędzy RANK i RANKL a obecnością przerzutów w narządach wewnętrznych.

W skali Tokuhashi, wraz z zaawansowaniem choroby nowotworowej ulegała podwyższeniu wartość mediany RANK. Przeprowadzone obliczenia statystyczne nie wykazały istotnych zależności pomiędzy RANK a stopniem zaawansowania choroby nowotworowej w skali Tokuhashi.

W badaniach stwierdziliśmy wysze wartości median RANK, RANKL i OPG u chorych z objawami immunosupresji, w porównaniu z grupą chorych w prawidłowym stanie immunologicznym wg skali De Walda. Nie wykazaliśmy statystycznych korelacji na poziomie istotności pomiędzy aktywnością wskaźników osteoklastogenezy nowotworowej a stanem immunologicznym chorego. W analizowanej grupie chorych obliczenia statystyczne

wykazał korelację na poziomie istotności statystycznej pomiędzy aktywnością RANK a poziomem fosfatazy zasadowej (ryc. 45).

Tabela 35. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka piersi z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do objawów choroby i wyników badań klinicznych

Dane kliniczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Lokalizacja w kręgosłupie jeden odcinek, n=7 (47%) dwa i trzy odcinki, n=8 (53%)	0,10 ⁺ 0,29 p= 0,76 ⁺⁺	0,47 0,22 p= 0,77	93,01 96,81 p= 0,68
Przerzuty w szkielecie kostnym tak, n=10 (67%) nie, n=5 (33%)	0,29 0,10 p= 1,00 ⁺⁺	0,22 0,47 p= 0,95	92,42 105,28 p= 0,95
Przerzuty w narządach wewnętrznych tak, n=3 (20%) nie, n=12 (80%)	0,48 0,05 p= 0,65 ⁺⁺	0,59 0,21 p= 0,22	91,84 97,40 p= 0,83
Skala Tokuhashi 1 do 8 punktów, n=9 (60%) 9 do 15 punktów, n=6 (40%)	0,10 0,26 p= 0,81 ⁺⁺	0,50 0,14 p= 0,09	101,78 77,12 p= 0,22
Skala De Walda prawidłowy stan immunologiczny, n=13 (87%) objawy immunosupresji, n=2 (13%)	0,10 0,28 p= 0,86 ⁺⁺	0,20 1,92 p= 0,07	91,84 233,02 p= 0,27
Skala Tomita T1-T5 zajęcie struktur kostnych kręgosłupa T6-T7 zajęcie struktur kostnych i przykręgosłupowych	p= 0,82 ⁺⁺	p= 0,03	p= 0,45
Ca (mmol/l)	p= 0,19 ⁺⁺⁺	p= 0,19	p= 0,48
Fosfataza zasadowa (U/L)	p= 0,006⁺⁺⁺	p= 0,69	p= 0,32

⁺mediana

⁺⁺test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺zależność monotoniczna Spearmana

W badaniach statystycznych dotyczących wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej stwierdziliśmy, że mediany RANKL i OPG u chorych leczonych chemioterapią, radioterapią, hormonoterapią i bifosfonianami w porównaniu do chorych, u których tego leczenia nie stosowano (tabela 36). W tej analizie nie stwierdziliśmy istotnej statystycznie korelacji pomiędzy aktywnością RANKL i OPG a zastosowanym leczeniem onkologicznym.

Tabela 36. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka piersi z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do leczenia onkologicznego

Leczenie onkologiczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Chemioterapia tak, n=12 (80%) nie, n=3 (20%)	0,29 ⁺ 0,10 p= 0,94 ⁺⁺	0,22 0,62 p= 0,71	92,42 101,78 p= 0,72
Radioterapia tak, n=11 (73%) nie, n=4 (27%)	0,10 0,43 p= 0,64 ⁺⁺	0,24 0,37 p= 0,74	93,01 93,58 p= 0,74
Hormonoterapia tak, n=12 (80%) nie, n=3 (20%)	0,05 0,57 p= 0,37 ⁺⁺	0,22 0,90 p= 0,34	92,42 139,08 p= 0,61
Bisfosfoniany tak, n=9 (60%) nie, n=6 (40%)	0,48 0,10 p= 0,85 ⁺⁺	0,24 0,32 p= 0,77	93,01 95,33 p= 0,95

⁺mediana

⁺⁺test Manna-Whitneya.

Tabela 37 przedstawia wartości median aktywności wskaźników w odniesieniu do wyników leczenia. Mediany RANK i RANKL były niższe u chorych z dobrym wynikiem leczenia, natomiast mediana OPG była podwyższona w porównaniu z grupą chorych ze złym wynikiem leczenia.

W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stężeniami RANK i RANKL a wynikiem leczenia.

Tabela 37. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka piersi z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do wyników leczenia

Wyniki leczenia	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Poprawa lub stabilizacja, n=8 (58%)	0,29 ⁺ p=0,89 ⁺⁺	0,19 p=0,55	96,81 p=0,65
Pogorszenie lub zgon, n=6 (42%)	0,31	0,545	89,195

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

5.2.4. Grupa I.3. Chorzy na raka prostaty z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa.

Badania statystyczne dotyczące median wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka prostaty z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa w odniesieniu do wieku i danych z wywiadu chorobowego przedstawia tabela 38.

Wy sze warto ci median CD44, tPA, OPN wykaza 6m u chorych, u których przerzut do kr gos 6pa by 6 pierwszym objawem choroby nowotworowej. W analizie wp 6wu obecno ci przerzutu do kr gos 6pa jako pierwszego objawu choroby nowotworowej na aktywno wska nik6w CD44, tPA i OPN nie wykaza 6m zale no ci na poziomie istotno ci statystycznej. aden z analizowanych chorych nie mia 6 operowanego ogniska pierwotnego. Nie stwierdzi 6m istotnej statystycznie korelacji pomi dzy aktywno ci badanych wska nik6w a d 6go ci czasu od wyst pienia objaw6w przerzutu do kr gos 6pa.

Tabela 38. Mediany wska nik6w biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka prostaty z przerzutem nowotworowym do kr gos 6pa w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego

Dane z wywiadu chorobowego	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Przerzut do kr gos 6pa pierwszym objawem choroby nowotworowej tak, n=3 (19%) nie, n=13 (81%)	365,44 ⁺ 432,89 p= 0,79 ⁺⁺	236,87 247,90 p= 0,59	183,78 160,80 p= 0,10	5714,34 5120,16 p= 0,50	633,99 661,79 p= 1,00	70870,31 31434,59 p= 0,69
Operacja ogniska pierwotnego	++++	_____	_____	_____	_____	_____
Czas od wyst pienia pierwszych objaw6w przerzutu nowotworowego do kr gos 6pa	p= 0,45 ⁺⁺⁺	p= 0,24	p= 0,57	p= 0,81	p= 0,38	p= 0,67

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ zale no monotoniczna Spearmana

⁺⁺⁺⁺ Nie by 6 operacji ogniska pierwotnego

Korelacji median wska nik6w biochemicznych kaskady nowotworowej z wynikami bada klinicznych przedstawia tabela 39. Mediany wszystkich wska nik6w biochemicznych (z wyj tkiem MMP2) by 6 podwy szone u chorych z zaj cciem dw6ch i trzech odcink6w kr gos 6pa, w por6wnaniu z grup chorych, u których przerzut nowotworowy obejmowa 6 jeden odcinek kr gos 6pa. W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdzi 6m istotnej statystycznie zale no ci pomi dzy st eniem analizowanych wska nik6w kaskady nowotworowej a rozleg 6 ci zmian w kr gos 6pie. Przerzuty w szkielecie kostnym wyst powa 6y u wszystkich analizowanych os6b.

Podwy szone warto mediany CD44 odnotowa 6m w przypadku obecno ci przerzut6w nowotworowych do narz d6w wewn trznych, a warto ci median pozosta 6ch wska nik6w by 6 obni one. Pomi dzy st eniem CD44 a obecno ci przerzut6w w narz dach wewn trznych nie wykaza 6m istotnej statystycznie zale no ci.

Tabela 39. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka prostaty z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do wyników badań klinicznych

Dane kliniczne	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Lokalizacja w kręgosłupie jeden odcinek (n=4) 25% dwa i trzy odcinki, (n=12) 75%	368,64 ⁺ 429,43 p= 0,95 ⁺⁺	243,70 242,38 p= 0,95	162,78 164,73 p= 0,90	5154,70 5225,35 p= 0,85	658,82 659,80 p= 0,95	21014,62 43527,06 p= 0,20
Przerzuty w szkieletcie kostnym	++++	_____	_____	_____	_____	_____
Przerzuty w narządach wewnętrznych tak, n=3 (19%) nie, n=13 (81%)	174,57 423,89 p= 0,22 ⁺⁺	212,38 247,90 p= 0,50	168,66 160,80 p= 0,34	4004,21 5189,25 p= 0,42	520,91 661,79 p= 0,22	9783,50 33938,49 p= 0,03
Skala Tokuhashi 1 do 8 punktów, n=9 (56%) 9 do 15 punktów, n=7 (44%)	352,75 423,89 p= 0,59 ⁺⁺	220,84 247,90 p= 0,75	168,66 160,80 p= 0,40	5426,61 5120,16 p= 0,60	616,13 699,54 p= 0,17	31182,29 32690,64 p= 1,00
Skala De Walda	+++++	_____	_____	_____	_____	_____
Ca (mmol)	p= 0,02 ⁺⁺⁺	p= 0,27	p= 0,85	p= 0,16	p= 0,19	p= 0,66
Fosfataza zasadowa (U/L)	p= 0,19 ⁺⁺⁺	p= 0,86	p= 0,27	p= 0,07	p= 0,27	p= 0,0009

⁺mediana

⁺⁺test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺zależność monotoniczna Spearmana

⁺⁺⁺⁺u wszystkich chorych był przerzut w szkieletcie kostnym

⁺⁺⁺⁺⁺brak możliwości sklasyfikowania chorych w skali De Walda

W odniesieniu do skali Tokuhashi warto ci median MMP9, MMP2, uPA i OPN były podwyższone u chorych z zaawansowanymi chorobami nowotworowymi, a mediany pozostałych wskaźników były obniżone. Nie uzyskaliśmy istotnych statystycznie korelacji pomiędzy aktywnością wskaźników kaskady nowotworowej a zaawansowaniem choroby nowotworowej w skali Tokuhashi. Specyfika badanej grupy nie pozwoliła na klasyfikację chorych w skali De Walda.

W analizowanej grupie chorych obliczenia statystyczne wykazały korelację na poziomie istotności statystycznej pomiędzy aktywnością MMP9 a poziomem wapnia zjonizowanego i pomiędzy aktywnością OPN a poziomem fosfatazy zasadowej (ryc. 46 i 47).

Aktywność wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w zależności od rodzaju leczenia onkologicznego przedstawiona jest w tabeli 40. U chorych leczonych chemioterapią stwierdzono niższe wartości median MMP9 i uPA, u poddanych radioterapii wykazano niższe wartości median MMP9, MMP2, CD44, tPA i OPN u osób, u których stosowano hormonoterapię odnotowano niższe wartości MMP2, uPA i OPN i u chorych leczonych bifosfonianami zaobserwowano niższe wartości MMP9, TPA, uPA i OPN

w porównaniu do chorych, u których tego leczenia nie zastosowano. Obliczenia nie wykazały istotnego statystycznie wpływu zastosowanego leczenia onkologicznego na stężenia wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej.

Tabela 40. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka prostaty z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do leczenia onkologicznego

Leczenie onkologiczne	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Chemioterapia tak, n=3 (19%) nie, n=13 (81%)	434,97 ⁺ 371,83 p= 0,59 ⁺⁺	220,84 247,90 p= 0,78	183,78 160,80 p= 0,78	5714,34 4736,35 p= 0,22	548,71 661,79 p= 0,50	32690,84 31434,59 p= 0,68
Radioterapia tak, n=6 (38%) nie, n=10 (62%)	359,10 462,34 p= 0,17 ⁺⁺	234,62 242,38 p= 0,62	148,28 168,66 p= 0,33	4825,35 5570,48 p= 0,62	672,72 636,97 p= 0,79	21768,8 42899,03 p= 0,28
Hormonoterapia tak, n=6 (38%) nie, n=10 (62%)	427,06 367,86 p= 0,41 ⁺⁺	216,61 257,23 p= 0,17	166,70 160,80 p= 0,83	5570,38 4928,26 p= 0,55	591,35 691,59 p= 0,11	23134,03 33314,56 p= 0,30
Bisfosfoniary tak, n=5 (31%) nie, n=11 (69%)	296,97 439,98 p= 0,14 ⁺⁺	295,86 236,87 p= 0,90	164,75 160,80 p= 0,78	5189,25 9120,16 p= 1,00	633,99 661,79 p= 0,73	10846,95 33938,49 p= 0,23

⁺ mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

Tabela 41 przedstawia wartości median aktywności wskaźników w odniesieniu do wyników leczenia. Mediany MMP9, tPA i uPA były niższe u chorych z dobrym wynikiem leczenia w porównaniu z grupą chorych ze złym wynikiem leczenia. Wartości median pozostałych wskaźników (MMP2, CD44 i OPN) były wyższe u chorych, u których odnotowano dobry wynik leczenia.

W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdziliśmy istotnej statystycznie różnicy pomiędzy stężeniem MMP9, tPA i uPA a wynikiem leczenia.

Tabela 41. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w podgrupie chorych na raka prostaty z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do wyników leczenia

Wyniki leczenia	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Poprawa lub stabilizacja n=7 (64%)	423,89 p=0,63 ⁺⁺	236,87 p=0,29 ⁺	168,66 p=0,29 ⁺	5426,61 p=0,21 ⁺	548,71 p=0,29 ⁺	31182,29 p=0,92 ⁺
Pogorszenie lub zgon n=4 (36%)	481,64 ⁺	208,47	141,11	6729,64	678,67	23888,20

⁺ mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

W badaniach statystycznych dotyczących wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej, w zakresie aktywności RANK, RANKL i OPG, w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego stwierdziliśmy podwyższenie mediany RANK u chorych, u których przerzut do kręgosłupa był pierwszym objawem choroby nowotworowej. Nie odnotowaliśmy zależności na poziomie istotności statystycznej pomiędzy aktywnością RANK a obecnością przerzutu nowotworowego do kręgosłupa jako pierwszego objawu choroby nowotworowej (tabela 42). Jeden z chorych nie miał leczonego operacyjnie ogniska pierwotnego. Odnotowaliśmy zależność na poziomie istotności statystycznej pomiędzy stężeniem OPG a czasem od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu do kręgosłupa (ryc. 48).

Tabela 42. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka prostaty z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do danych z wywiadu chorobowego

Dane z wywiadu chorobowego	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Przerzut do kręgosłupa pierwszym objawem choroby nowotworowej tak, n=3 (19%) nie, n=13 (81%)	0,44 ⁺ 0,11 p= 1,00 ⁺⁺	0,30 0,40 p= 1,00	64,12 96,52 p= 0,84
Operacja ogniska pierwotnego	++++ —————	—————	—————
Czas od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa	p= 0,30 ⁺⁺	p= 0,97	p= 0,01

⁺mediana

⁺⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺ zależność monotoniczna Spearmana

⁺⁺⁺⁺ nie było operacji ogniska pierwotnego

Korelacja wartości median wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej z wynikami badań klinicznych przedstawia tabela 43. Mediana OPG była podwyższona, u chorych z zajęciem dwóch i trzech odcinków kręgosłupa, w porównaniu z grupą chorych u których przerzut nowotworowy obejmował jeden odcinek kręgosłupa. W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdziliśmy istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniem OPG a rozległości zmian w kręgosłupie. W analizowanej grupie osób u wszystkich stwierdzono przerzuty w innych częściach szkieletu kostnego.

U chorych z obecnością przerzutów w narządach wewnętrznych była podwyższona mediana OPG. Nie wykazaliśmy zależności na poziomie istotności statystycznej pomiędzy aktywnością OPG a obecnością przerzutów w narządach wewnętrznych.

W skali Tokuhatchi, wraz z zaawansowaniem choroby nowotworowej ulegała podwyższeniu wartość mediany RANK i RANKL. Przeprowadzone obliczenia statystyczne

nie wykazał istotnych zależności pomiędzy RANK i RANKL a stopniem zaawansowania choroby nowotworowej w skali Tokuhashi.

Z uwagi na specyfikę badanej grupy nie było możliwe przeprowadzenie klasyfikacji chorych w skali de Walda.

Statystyczna korelacja na poziomie istotności wykazała się pomiędzy aktywnością OPG a poziomem wapnia zjonizowanego (ryc. 49).

Tabela 43. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka prostaty z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do objawów choroby i wyników badań klinicznych

Dane kliniczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Lokalizacja w kręgosłupie jeden odcinek, n=4 (25%) dwa i trzy odcinki, n=12 (75%)	0,22 ⁺ 0,16 p= 0,95 ⁺⁺	0,41 0,32 p= 0,40	62,92 98,56 p= 0,33
Przerzuty w szkieletcie kostnym	++++ —————	—————	—————
Przerzuty w narządach wewnętrznych tak, n=3 (19%) nie, n=13 (81%)	0,00 2,44 p= 0,26 ⁺⁺	0,24 0,40 p= 0,6	96,52 72,42 p= 0,90
Skala Tokuhashi 1 do 8 punktów, n=9 (56%) 9 do 15 punktów, n=7 (44%)	0,11 0,44 p= 0,91 ⁺⁺	0,12 0,41 p= 0,08	96,52 72,42 p= 0,79
Skala De Walda	+++++ —————	—————	—————
Ca (mmol)	p= 0,76 ⁺⁺⁺	p= 0,12	p= 0,02
Fosfataza zasadowa (U/L)	p= 0,40 ⁺⁺⁺	p= 0,54	p= 0,19

⁺mediana

⁺⁺test Manna-Whitneya

⁺⁺⁺zależność monotoniczna Spearmana

⁺⁺⁺⁺u wszystkich chorych było przerzuty w szkieletcie kostnym

⁺⁺⁺⁺⁺brak możliwości sklasyfikowania chorych w skali De Wolda

W badaniach statystycznych dotyczących wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej stwierdziliśmy nieliczne mediany RANK i RANKL u chorych leczonych chemioterapią, radioterapią i hormonoterapią w porównaniu do chorych, u których tego leczenia nie stosowano (tabela 44). W tej analizie stwierdziliśmy istotne statystycznie korelacje pomiędzy aktywnością RANKL a zastosowaniem hormonoterapii (ryc. 50). Mediany OPG były nieliczne w grupach chorych, u których stosowano chemioterapię, radioterapię, hormonoterapię i bifosfoniany, a badania zależności korelacji pomiędzy aktywnością OPG, a zastosowaniem bifosfonianów stwierdziliśmy na poziomie istotności statystycznej (ryc. 51).

Tabela 44. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka prostaty z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do leczenia onkologicznego

Leczenie onkologiczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Chemioterapia tak, n=3 (19%) nie, n=13 (81%)	0,00 ⁺ 0,21 p= 0,48 ⁺⁺	0,12 0,41 p= 0,20	61,73 100,61 p= 0,07
Radioterapia tak, n=6 (38%) nie, n=10 (62%)	0,16 0,235 p= 0,95 ⁺⁺	0,44 0,18 p= 0,36	68,86 98,56 p= 0,45
Hormonoterapia tak, n=6 (38%) nie, n=10 (62%)	0,05 0,34 p= 0,33 ⁺⁺	0,09 0,47 p= 0,003	80,32 87,10 p= 0,91
Bisfosfoniany tak, n=5 (31%) nie, n=11 (69%)	0,21 0,11 p= 0,72 ⁺⁺	0,40 0,24 p= 1,00	64,12 120,44 p= 0,04

⁺mediana

⁺⁺test Manna-Whitneya

Tabela 45 przedstawia wartości median aktywności wskaźników w odniesieniu do wyników leczenia. Mediany RANK, RANKL i OPG były niższe u chorych z dobrym wynikiem leczenia w porównaniu z grupą chorych ze złym wynikiem leczenia. W przeprowadzonych obliczeniach nie stwierdziliśmy istotnych statystycznie różnic pomiędzy stężeniem RANK, RANKL i OPG a wynikiem leczenia.

Tabela 45. Mediany wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w podgrupie chorych na raka prostaty z przerzutem nowotworowym do kręgosłupa w odniesieniu do wyników leczenia

Wyniki leczenia	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (pg/ml)
Poprawa lub stabilizacja, n=7 (64%)	0,00 ⁺ p=0,58 ⁺⁺	0,12 p=0,50	72,42 p=0,92
Pogorszenie lub zgon, n=4 (36%)	0,22	0,35	124,04

⁺mediana

⁺⁺test Manna-Whitneya

6. Podsumowanie wyników

W tym rozdziale zostały zestawione wybrane wyniki (z poprzedniego rozdziału) aktywności badanych wskaźników kaskady i osteoklastogenezy nowotworowej i ich korelacje z pierwotnym umiejscowieniem nowotworu, rozległości zmian nowotworowych w kręgosłupie, szkieletie kostnym. Również zostały podsumowane korelacje wartości

wskańników ze skalami Tokuhashi, De Walda, poziomem wapnia zjonizowanego i fosfatazy zasadowej oraz zastosowanym leczeniem onkologicznym.

6.1. Porównanie aktywności wskańników kaskady nowotworowej

Porównanie wartości median wskańników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie I ó chorzy z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym nowotworu i podgrupach: I.1 ó chorzy na raka nerki z przerzutami do kręgosłupa, I.2 ó chore na raka piersi przerzutami do kręgosłupa, I.3 ó chorzy na raka prostaty przerzutami do kręgosłupa w odniesieniu do podgrup kontrolnych (tabela 46). Wartości median MMP2 i tPA były podwyższone, natomiast ekspresja MMP9 była obniżona w grupie I i podgrupach I.1, I.2, I.3. Mediany CD44 i OPN wykazywały podwyższone wartości w grupie I, I.2 i I.3 poza grupę chorych na raka nerki z przerzutami (I.1). Ekspresja uPA była obniżona u wszystkich chorych, poza podgrupę chorych na raka z przerzutami (podgrupa I.3). Zależności na poziomie istotności statystycznej odnotowano między stężeniem MMP9 u chorych w grupie I i podgrupach I.1 i I.3 a grupami kontrolnymi II i podgrupami kontrolnymi (II.1, II.3) i między ekspresją tPA i OPN w grupie I a grupami kontrolnymi (II).

Tabela 46. Porównanie wartości median wskańników biochemicznych kaskady nowotworowej w zależności od ogniska pierwotnego nowotworu

Wskańniki biochemiczne	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Grupa I, n= 60	⁺ p=0,01 ⁺			p= 0,003		p=0,01
Podgrupa I.1, n=15	p= 0,004 ⁺					
Podgrupa I.2, n=15						
Podgrupa I.3, n=15	p=0,09 ⁺					

⁺ wzrost wartości mediany, ⁻ zmniejszenie wartości mediany
⁺⁺ test Manna-Whitneya

Zależności między aktywnością median wskańników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie I i podgrupach: I.1, I.2, I.3 a rozległości przerzutów nowotworowych w kręgosłupie przedstawia tabela 47. Podwyższone wartości mediany wskańnika OPN odnotowano w grupie I i we wszystkich podgrupach (I.1, I.2, I.3). Korelacja ta wykazała zależność na poziomie istotności statystycznej między ekspresją OPN w grupie I a rozległości przerzutów nowotworowych w kręgosłupie. W zakresie aktywności MMP9 (za wyjątkiem podgrupy I.2), MMP2 (za wyjątkiem podgrupy I.3), tPA (za wyjątkiem podgrupy I.1), uPA (za wyjątkiem podgrupy I.1) odnotowano podwyższone wartości median badanych wskańników. W przeprowadzonych obliczeniach wykazała zależność na poziomie

istotno ci statystycznej pomi dzy wzrostem ekspresji uPA w podgrupie I.2 a rozlegoci przerzutów w kr goscie.

Tabela 47. Porównanie warto ci median wska ników biochemicznych kaskady nowotworowej z rozlegoci przerzutów nowotworowych w kr goscie

Analizowani chorzy	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Grupa I, n= 60	+					p=0,05⁺
Podgrupa I.1, n=15						
Podgrupa I.2, n=15					p=0,04⁺	
Podgrupa I.3, n=15						

⁺ wzrost warto ci mediany, zmniejszenie warto ci mediany

⁺⁺ test Manna Whitneya

Zale no ci pomi dzy warto ciami median wska ników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie I i podgrupach: I.1, I.2 a obecno ci przerzutów w szkielecie kostnym, przedstawia tabela 48. Podwy szon ekspresj wska ników MMP2, CD44, OPN i obni on MMP9 odnotowa em w grupie I i w podgrupach I.1, I.2 (badania wykaza y zale no ci na poziomie istotno ci statystycznej pomi dzy aktywno ci MMP2, CD44 a obecno ci przerzutów nowotworowych w szkielecie kostnym w grupie I). W zakresie aktywno ci tPA, uPA takich zale no ci nie wykaza em.

Tabela 48. Porównanie warto ci median wska ników biochemicznych kaskady nowotworowej, a obecno ci przerzutów nowotworowych w szkielecie kostnym

Analizowani chorzy	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Grupa I, n= 60	+	p=0,04⁺	p=0,04		p=0,003	
Podgrupa I.1, n=15						
Podgrupa I.2, n=15						
Podgrupa I.3, n=15	_____ ⁺⁺	_____	_____	_____	_____	_____

⁺ wzrost warto ci mediany, zmniejszenie warto ci mediany

⁺ test Manna Whitneya

⁺⁺ u wszystkich chorych by y przerzuty w szkielecie kostnym

Zale no ci pomi dzy warto ciami median wska ników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie I i podgrupach: I.1, I.2, I.3 a zaawansowaniem choroby nowotworowej w skali Tokuhashi przedstawia tabela 49. Wzrost warto ci median wska ników MMP9 i uPA (z wyj tkiem podgrupy II.2) odnotowa em w grupie I i wszystkich badanych podgrupach (korelacje te nie wykaza y istotno ci statystycznych). W zakresie aktywno ci MMP2, CD44, tPA takich zale no ci nie wykaza em.

Tabela 49. Porównanie wartości median wskaźników biochemicznych ze skali Tokuhashi

Analizowani chorzy	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Grupa I, n= 60	+			p=0,05⁺		
Podgrupa I.1, n=15						
Podgrupa I.2, n=15						p=0,03⁺
Podgrupa I.3, n=15						

⁺ wzrost wartości mediany, ⁻ zmniejszenie wartości mediany

⁺ test Manna-Whitneya

Zależności pomiędzy wartościami median wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie I i podgrupach: I.1, I.2, I.3 a stanem immunologicznym wg skali de Walda przedstawia tabela 50. Wzrost wartości median wszystkich badanych wskaźników: MMP9, MMP2, CD44, tPA, uPA i OPN wykazał w grupie I i wszystkich badanych podgrupach. Przeprowadzone obliczenia statystyczne wykazały zależność na poziomie istotności pomiędzy wzrostem stężenia CD44, tPA w grupie I i tPA, uPA w podgrupie I.2 a stanem immunologicznym chorych.

Tabela 50. Porównanie wartości median wskaźników biochemicznych ze skali De Walda

Analizowani chorzy	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Grupa I, n= 60	+		p=0,04⁺	p=0,00		p=0,03
Podgrupa I.1, n=15						
Podgrupa I.2, n=15				p=0,03⁺	p=0,03	
Podgrupa I.3, n=15	_____ ⁺⁺	_____	_____	_____	_____	_____

⁺ wzrost wartości mediany, ⁻ zmniejszenie wartości mediany

⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺ brak możliwości sklasyfikowania chorych w skali De Walda

Zależność na poziomie istotności statystycznej (zależność monotoniczna Spearmana) wykazał pomiędzy MMP9 w podgrupie I.3 i MMP2 w podgrupie I.2 a poziomem wapnia zjonizowanego we krwi (ryc. 44).

Zależność na poziomie istotności statystycznej wykazał pomiędzy aktywnością tPA, uPA, OPN w grupie I i pomiędzy OPN w podgrupach I.1 i I.3 a poziomem aktywności fosfatazy zasadowej (ryc. 47).

Zależność pomiędzy wartościami median wskaźników biochemicznych kaskady nowotworowej w grupie I i podgrupach: I.1, I.2, I.3 a zastosowanym leczeniem onkologicznym przedstawia tabela 51. Podwyższonej ekspresji wskaźników MMP2, uPA

i obni on MMP9, OPN odnotowa€m w grupie I.

Wykaza€m zale no ci na poziomie istotno ci statystycznej pomi dzy aktywno ci MMP9, MMP2 i OPN a zastosowan radioterapi i OPN a zastosowaniem bifosfonianów. Obni on ekspresj MMP9 i tPA wykaza€m u chorych z przerzutami z nerki (podgrupa I.1). Obliczenia statystyczne wykaza€ zale no na poziomie istotno ci pomi dzy st eniem MMP9 a zastosowaniem radioterapii i pomi dzy aktywno ci MMP9 i tPA a zastosowaniem bifosfonianów.

Spadek ekspresji tPA i OPN i wzrost ekspresji uPA wykaza€m u chorych z przerzutami z piersi (podgrupa I.2). Nie wykaza€m zale no ci na poziomie istotno ci statystycznej pomi dzy st eniem tPA, OPN i uPA a poszczególnymi sposobami leczenia onkologicznego u chorych na raka piersi z przerzutami nowotworowymi.

Tabela 51. Korelacja pomi dzy warto ciami median wska ników biochemicznych, a zastosowanym leczeniem onkologicznym

Analizowani chorzy	MMP9 (ng/ml)	MMP2 (ng/ml)	CD44 (ng/ml)	tPA (pg/ml)	uPA (pg/ml)	OPN (pg/ml)
Grupa I, n= 60						
chemioterapia	+					
radioterapia	p=0,004 ⁺	p=0,013				p=0,004
hormonoterapia						
bifosfoniany			p=0,01 ⁺	p=0,01		p=0,03
Podgrupa I.1, n=15						
chemioterapia						
radioterapia	p=0,01 ⁺					
hormonoterapia	_____++	_____	_____	_____	_____	_____
bifosfoniany	p=0,03 ⁺			p=0,04		
Podgrupa I.2, n=15						
chemioterapia		p=0,04 ⁺				
radioterapia		p=0,01 ⁺				
hormonoterapia						
bifosfoniany			p=0,05 ⁺			
Podgrupa I.3, n=15						
chemioterapia						
radioterapia						
hormonoterapia						
bifosfoniany						

+ wzrost warto ci mediany, - zmniejszenie warto ci mediany

⁺test Manna Whitneya

++ nie by€ zastosowana hormonoterapia

6.2. Porównanie aktywności wskaźników kaskady osteoklastogenezy

Porównanie wartości median wskaźników biochemicznych kaskady osteogenezy nowotworowej w grupie I ó chorzy z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym nowotworu i podgrupach: I.1 ó chorzy na raka nerki z przerzutami do kręgosłupa, I.2 ó chore na raka piersi z przerzutami do kręgosłupa, I.3 ó chorzy na raka prostaty z przerzutami do kręgosłupa w odniesieniu do podgrup kontrolnych (tabela 52). Wartości median OPG były podwyższone w grupie I i podgrupach: I.1, I.2, I.3 (zależność na poziomie istotności statystycznej stwierdziliśmy pomiędzy grupą I, a grupą kontrolną II). Aktywność RANK (za wyjątkiem podgrupy I.2) i RANKL (za wyjątkiem podgrupy I.3) były te podwyższone. W badaniach statystycznych wykazaliśmy zależność na poziomie istotności w zakresie aktywności RANKL pomiędzy podgrupą I.2 a podgrupą kontrolną II.

Tabela 52. Porównanie wartości median wskaźników biochemicznych kaskady osteoklastogenezy nowotworowej w zależności od ogniska pierwotnego nowotworu

Wskaźniki biochemiczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (ng/ml)
Grupa I n=60	+		p=0,01
Podgrupa I.1, n=15			
Podgrupa I.2, n=15		p=0,01⁺	
Podgrupa I.3, n=15			

+ wzrost wartości mediany, - zmniejszenie wartości mediany

⁺ test Manna-Whitneya

Zależności pomiędzy wartościami median wskaźników biochemicznych osteoklastogenezy nowotworowej w grupie I i podgrupach: I.1, I.2, I.3 a rozległości przerzutów nowotworowych w kręgosłupie przedstawia tabela 53. Obniżone wartości median wskaźnika RANKL odnotowaliśmy we wszystkich analizowanych grupach (korelacja ta nie wykazała istotności statystycznej). Podobnej zależności i innych nie stwierdziliśmy pomiędzy RANK i OPG a rozległości przerzutów nowotworowych w kręgosłupie.

Tabela 53. Zależności pomiędzy wartościami median wskaźników biochemicznych, a rozległości przerzutów nowotworowych w kręgosłupie

Wskaźniki biochemiczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (ng/ml)
Grupa I n=60	+		
Podgrupa I.1, n=15			
Podgrupa I.2, n=15			
Podgrupa I.3, n=15			

+ wzrost wartości mediany, - zmniejszenie wartości mediany

Zależności pomiędzy wartościami median wskaźników biochemicznych osteoklastogenezy nowotworowej w grupie I i podgrupach: I.1, I.2, I.3 a obecności przerzutów w szkieletcie kostnym przedstawia tabela 54. Obniżenie wartości median wskaźnika OPG odnotowano w grupie I i w podgrupach I.1, I.2. Przeprowadzone obliczenia nie wykazały istotności statystycznej pomiędzy aktywnością OPG a obecnością przerzutów w innych częściach szkieletu kostnego.

Tabela 54. Porównanie wartości median wskaźników biochemicznych z obecnością przerzutów nowotworowych w szkieletcie kostnym

Wskaźniki biochemiczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (ng/ml)
Grupa I n=60	+		
Podgrupa I.1, n=15			
Podgrupa I.2, n=15			
Podgrupa I.3, n=15	————++	————	————

+ wzrost wartości mediany, zmniejszenie wartości mediany

++ u wszystkich chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa obecne były przerzuty w innych częściach szkieletu kostnego

Zależności pomiędzy wartościami median wskaźników biochemicznych osteoklastogenezy nowotworowej w grupie I i podgrupach: I.1, I.2, I.3 a zaawansowaniem choroby nowotworowej w skali Tokuhashi przedstawia tabela 55. Wzrost ekspresji wskaźnika RANK odnotowano w grupie I i wszystkich badanych podgrupach, ale nie wykazały korelacji na poziomie istotności statystycznej. W zakresie aktywności OPG (z wyjątkiem podgrupy I.1) stwierdzono spadek ekspresji, ale te nie wykazały korelacji na poziomie istotności statystycznej pomiędzy aktywnością OPG a zaawansowaniem choroby w skali Tokuhashi.

Tabela 55. Porównanie wartości median wskaźników biochemicznych ze skalą Tokuhashi

Wskaźniki biochemiczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (ng/ml)
Grupa I n=60	+		
Podgrupa I.1, n=15			
Podgrupa I.2, n=15			
Podgrupa I.3, n=15			

+ wzrost wartości mediany, zmniejszenie wartości mediany

Zależności pomiędzy wartościami median wskaźników biochemicznych osteoklastogenezy nowotworowej w grupie I i podgrupach: I.1, I.2 przedstawia tabela 56. Wzrost ekspresji wskaźników RANK, RANKL i OPG wykazano w grupie I i wszystkich podgrupach (za wyjątkiem OPG w podgrupie I.1). Przeprowadzone obliczenia statystyczne wykazały zależność na poziomie istotności pomiędzy wzrostem stężenia RANKL, a stanem immunologicznym chorych.

Tabela 56. Porównanie wartości median wskaźników biochemicznych ze skali De Walda

Wskaźniki biochemiczne	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (ng/ml)
Grupa I n=60	+	p=0,04⁺	
Podgrupa I.1, n=15			
Podgrupa I.2, n=15			
Podgrupa I.3, n=15	_____ ⁺⁺	_____	_____

⁺ wzrost wartości mediany, zmniejszenie wartości mediany

⁺ test Manna-Whitneya

⁺⁺ brak możliwości sklasyfikowania chorych w skali De Walda

Zależności na poziomie istotności statystycznej (zależności monotoniczna Spearmana) wykazano pomiędzy OPG w podgrupie I.3, a poziomem wapnia zjonizowanego we krwi (ryc. 48). Zależności na poziomie istotności statystycznej (zależności monotoniczna Spearmana) wykazano pomiędzy aktywnością RANK w grupie I, podgrupach I.1, I.2 i pomiędzy OPG, w grupie I a poziomem aktywności fosfatazy zasadowej (ryc. 51).

Zależności pomiędzy wartościami median wskaźników biochemicznych osteoklastogenezy nowotworowej w grupie I i podgrupach: I.1, I.2, I.3 a zastosowanym leczeniem onkologicznym przedstawia tabela 57. Obniżono ekspresję wskaźnika RANKL odnotowano w podgrupie I.2. Nie wykazano zależności na poziomie istotności statystycznej pomiędzy aktywnością RANKL a zastosowanymi chemioterapią, radioterapią, hormonoterapią i bifosfonianami, w podgrupie I.2. Obniżono ekspresję wskaźnika OPG, wykazano u chorych w grupie I i podgrupach: I.2, I.3. Obliczenia statystyczne wykazały zależność na poziomie istotności pomiędzy stężeniem OPG a zastosowaniem bifosfonianów, w podgrupie I.3.

Tabela 57. Porównanie wartości median wskaźników biochemicznych, a zastosowanym leczeniem onkologicznym

Analizowani chorzy	RANK (ng/ml)	RANKL (ng/ml)	OPG (ng/ml)
Grupa I, n= 60			
chemioterapia	+		
radioterapia			
hormonoterapia			
bifosfoniany			
Podgrupa I.1, n=15			
chemioterapia			
radioterapia		p=0,03+	
hormonoterapia	_____++	_____	_____
bifosfoniany			
Podgrupa I.2, n=15			
chemioterapia			
radioterapia			
hormonoterapia			
bifosfoniany			
Podgrupa I.3, n=15			
chemioterapia			
radioterapia			
hormonoterapia		p=0,003+	
bifosfoniany			p=0,04+

+ wzrost wartości mediany, zmniejszenie wartości mediany

+ test Manna-Whitneya

** brak możliwości sklasyfikowania chorych w skali De Walda

7. Dyskusja

Złone są procesy komórkowe i molekularne w kaskadzie i osteoklastogenezie nowotworowej. Niektóre zmiany ogólnoustrojowe zwiększają ryzyko rozsiewu choroby. Do takich czynników należą: stres, zabiegi chirurgiczne, radioterapia i inne. Poznanie roli nowotworowych komórek macierzystych, przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego i immunosupresji w procesie onkogenezy jest jednym z priorytetów współczesnej medycyny [119, 137].

Nowotworowe komórki macierzyste są populacją niezniszczalnymi, samoodnawiającymi się komórkami w guzie nowotworowym, są odpowiedzialne za wzrost guza i tworzenie wtórnych ognisk nowotworu. Podobnie jak inne komórki macierzyste funkcjonują w otoczeniu innych komórek organizmu tzw. niszy, skąd czerpią sygnały do różnicowania i proliferacji. Zaburzenia w szlakach sygnałowych pomiędzy nowotworowymi komórkami macierzystymi a niszą, wynikające m.in. z nabytych mutacji onkogennych, mogą prowadzić do niekontrolowanych podziałów komórek macierzystych i ich niezależnego od pierwotnej niszy lub zajmowania nowego mikrośrodowiska [150].

Coraz więcej danych wskazuje na to, iż główną przyczyną progresji nowotworu jest przejście epitelialno-mezenchymalne (EMT), podczas którego zmiana ulega synteza szeregu białek uwarunkowana, między innymi, zmianami profilu ekspresji kodujących genów. Proces przejścia epitelialno-mezenchymalnego jest bezpośrednio związany z różnicowaniem oraz zaburzeniami różnicowania komórek macierzystych, utratą ich charakterystycznych właściwości, a także wzrostem ich migracji. Należy dodać, iż EMT pobudza składowiki macierzy komórkowej i aktywuje kaskady sygnałowe [140]. Gos i wsp. w 2009 roku opisał w swojej pracy wpływ EMT na zmianę fenotypu komórki nabłonkowej, co jest ściśle związane ze wzrostem inwazyjności komórek. Do czynników kontrolujących ten proces należą między innymi: TGF- β , Wnt i FGF. Markery, których synteza wzrasta najbardziej na skutek przejścia EMT, to różnicowa białka, MMP oraz czynniki transkrypcyjne, co znajduje potwierdzenie w badaniu własnym.

Molekularnym zmianom podczas EMT towarzyszą zmiany morfologiczne, których efektem jest zmiana fenotypu epitelialnego na mezenchymalny. Po utworzeniu przerzutu komórki nowotworowe ulegają procesowi odwrotnemu do MET (przejście mezenchymalne do epitelialne) [133]. Obserwując wyniki uzyskane w kaskadzie nowotworowej w badaniu własnym, najwyższą ekspresję w przypadku metaloproteinaz z przerzutami nowotworowymi, m.in. chorych na raka nerki, piersi i prostaty do kręgosłupa odnotowano w przypadku

metaloproteinazy 2. Pomimo wykazania, przez innych autorów znacznego wpływu ekspresji MMP9 na tworzenia przerzutów, w mojej analizie był to czynnik wykazujący najniższą ekspresję [8, 34].

Potwierdzenie wpływu ekspresji analizowanych enzymów na powstawanie zmian nowotworowych można znaleźć w wielu doniesieniach naukowych. Liu B. i wsp. [80] wskazują MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 i MMP13 jako czynniki związane z powstawaniem przerzutów nowotworowych. Spośród nich wyróżniają MMP2 oraz MMP9 jako przyczyn powstawania ognisk wtórnych w kości. MMP2 jest wydzielana przede wszystkim przez fibroblasty i osteoblasty oraz uczestniczy w procesie aktywacji MMP13 i niszczenia bony podstawnej, podczas gdy MMP9, wydzielana głównie przez osteoklasty i komórki systemu immunologicznego, w tym makrofagi i neutrofile, jest związana z procesem rozrostu guza. Oba enzymy mają zdolność rozszczepiania kolagenu typu I, II, V i odgrywają istotną rolę w degradacji macierzy kostnej [80]. W własnej analizowanej grupie chorych stwierdzono ekspresję MMP2 i MMP9 jako charakterystyczną dla przerzutów raka piersi i prostaty do kręgosłupa.

Jak podkreśla Tauro i wsp. [138] przerzuty do kości, w tym do kręgosłupa, są częste w rozwoju raka piersi i siłają około 80%. W nowotworach prostaty, przerzuty do kości występują u prawie 90% chorych (6). Według badaczy, podwyższona ekspresja MMP2 jest ściśle powiązana ze stopniem agresji komórek rakowych oraz przeżywalnością [17, 138]. Prowadzili oni badania nad poziomem ekspresji MMP2 i MMP9, których wydzielanie związane jest z powstawaniem przerzutowych komórek nowotworowych, zwłaszcza do kości. Pod uwagę wzięto dwie linie komórkowe u pacjentek z nowotworem piersi - MDA-MB-231 i MCF-7 oraz linię kontrolną HS578Bstór zdrowe komórki przylegające do nowotworu na odcinku 10 cm. Próbkę została pobrana od 80 chorych oraz 40 tkanek z grupy kontrolnej i zbadane przy pomocy IHC. Wykazała ekspresja obu markerów została odnotowana w komórkach nowotworowych, u 83,75% kobiet ($p < 0.01$). Jest to kolejny dowód na to, że badanie ekspresji markerów są istotny czynnik prognostyczny w nowotworze piersi i jest bezpośrednio związane ze zmianami nowotworowymi oraz przerzutowymi do kręgosłupa.

Tauro i wsp. ó 2017 uważają, że odpowiednio dobrane inhibitory MMP2 i innych metaloproteinaz mogą poprawić wyniki leczenia przerzutów nowotworowych do kości.

W grupie chorych w badaniu własnym, zwiększona ekspresja MMP2 miała miejsce również u pacjentów ze zmianami przerzutowymi do kręgosłupa w raku nerki. Nie wykazano jednak istotności statystycznej pomiędzy grupą chorych z przerzutami i bez. Istnieje jednak

publikacje, w których wykazano istotną korelację pomiędzy ekspresją MMP2 a przerzutami do kości [8, 34, 77].

Wang i wsp. z 2015 wykazali istotną statystycznie ($p < 0,05$) badając wpływ ekspresji EZH2, MMP2 i TIMP2 na powstawanie zmian przerzutowych do kręgosłupa u pacjentów z rakiem nerki. Analizując doniesienia na temat przerzutów do kości, należy podkreślić ogromne znaczenie wskaźników biochemicznych jako czynników prognostycznych, mogących wpłynąć na leczenie chorych. W badaniu przeprowadzonym przez Woodwarda i wsp. z 2011 na grupie 803 chorych z rakiem nerki, przerzuty do kości pojawiły się u 32% pacjentów. Na podstawie analizy pi miennictwa, Santini i wsp. z 2013 dowiedli, że średni czas pojawienia się przerzutu do kości u pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem nerki wynosi średnio 25 miesięcy (10).

Biorąc pod uwagę badania nad ekspresją genów kodujących MMP w raku pęcherza, należy zauważyć, iż skupiają się one w większości na analizie związku z MMP2 oraz MMP9. Genom kodującym inne metaloproteiny poświęca się mniej uwagi, ponieważ odgrywają one rolę zarówno w zdrowych tkankach, jak i procesach patologicznych. W dostępnym dla mnie pracach wykazano, że poziom ekspresji np. MMP3, MMP8, MMP12, MMP13, MMP15 czy MMP28 pozostaje czysto taki sam, zarówno w przypadku komórek zdrowych, jak i dotkniętych nowotworem [78]. Geny, których ekspresja jest podwyższona w tkance nowotworowej w raku pęcherza, obejmują: MMP1, MMP2, MMP7, MMP9, MMP12 oraz MMP14 [8]. W badaniu przeprowadzonym przez Gokaslana i wsp. z 1998 wykazano wysłą ekspresję MMP9 u osób z nowotworem pęcherza u osób ze zdiagnozowanym rakiem piersi, tarczycy i nerki. Ekspresja MMP2 i MMP9 zwiększa się wraz ze stopniem zaawansowania nowotworu w przypadku nowotworu pęcherza [8].

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach poziom MMP9 był podwyższony u chorych z nowotworami nerki, piersi i prostaty oraz według kryterium skali Tokuhashi wraz z zaawansowaniem choroby nowotworowej, natomiast poziom MMP2 był u nich obniżony. Pomimo, że powyższa korelacja nie była na poziomie istotności statystycznej, oznaczenie tych markerów może odzwierciedlać stopień zaawansowania choroby nowotworowej.

Kolejnym ciekawym spostrzeżeniem jest obniżenie poziomu MMP9 u chorych z przerzutami do kręgosłupa z nerki i piersi, którzy byli leczeni chemioterapią, radioterapią i bifosfonianami. Korelacja na poziomie istotności statystycznej odnotowaliśmy u chorych na raka nerki z przerzutami do kręgosłupa leczonych radioterapią ($p < 0,01$) i bifosfonianami ($p < 0,05$). Oznaczenie MMP9 w tych podgrupach chorych może być przydatne w monitorowaniu leczenia.

Osteopontyna jest jednym z markerów z wyboru przy monitorowaniu leczenia choroby nowotworowej, dzięki któremu można kontrolować proces namnaiania komórek nowotworowych. Dane otrzymane w badaniu w tym samym pozwalają potwierdzić związek zachodzący pomiędzy zwiększonym stężeniem OPN a progresją choroby.

W literaturze można znaleźć informacje na temat związku nadekspresji OPN z tworzeniem przerzutów nowotworowych w wielu narządach. W przypadku nowotworu piersi, jajnika i prostaty OPN wiąże się do powierzchniowych integryn $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 3$, co skutkuje zwiększeniem adhezji komórek oraz ich migracji. W przypadku raka pęcherza OPN bierze udział w zaniu CD44 z integrynami, aktywuje FAK, Pi3K i AKT oraz wzmacnia działanie VEGF. OPN jest związane ze zwiększonym uwalnianiem metyloproteinaz w przypadku nowotworu mózgu, w tarczycy, trzustki, jelita grubego, jajnika, prostaty oraz naczyń, a co za tym idzie z progresją nowotworu [14, 67, 112, 156].

Et-Tanani i wsp. (2006) potwierdzają swoją analizę prawidłowo o korelacji wzrostu poziomu OPN z powstaniem nowotworu oraz tworzeniem zmian przerzutowych do innych narządów [40].

W badaniu w tym samym wykazano podwyższoną ekspresję OPN u chorych z przerzutami do kręgosłupa, w porównaniu z grupą chorych bez ognisk wtórnych, niezależnie od lokalizacji ogniska pierwotnego ($p < 0,01$). Podwyższone wartości OPN korelowały w mojej analizie z rozległością przerzutów nowotworowych w kręgosłupie ($p < 0,05$) i szkieletu (p < 0,03).

Podwyższony poziom OPN wykazałem także u chorych z obecnością przerzutów w innych częściach szkieletu kostnego, ale nie wykazałem korelacji na poziomie istotności statystycznej. Podobne wyniki otrzymał Ramankulov i wsp. (2007) w badaniach na grupie 80 pacjentów z rakiem nerki u których występowały przerzuty. Badanie wykazało istotnie wyższy poziom stężenia OPN. Wysoki poziom OPN wiąże się również z krótką przeżywalnością [112].

Stężenie OPN może być czynnikiem prognostycznym w przypadkach występowania kostnych zmian przerzutowych w nowotworach piersi, prostaty, pęcherza czy szyjki macicy [67]. Potwierdzają to moje wyniki badań, u chorych o lepszym rokowaniu mediana wartości OPN, w przypadkach przerzutów do kręgosłupa z nerki i piersi, była niższa niż u chorych, u których obserwowano pogorszenie lub zgon, ale nie wykazałem zależności na poziomie istotności statystycznej.

Ramankulov i wsp. (2017) sugeruje uzależnienie procesu terapeutycznego raka piersi i prostaty w zależności od poziomu OPN. W przypadku raka prostaty wynika to z faktu,

ęstnienie OPN zmienia się równolegle ze stopniem zaawansowania nowotworu [112].

Na podstawie analiz, Pio i wsp. 2017 wykazali istotną statystycznie różnicę ($p < 0.05$) pomiędzy nadekspresją OPN a zmianami przerzutowymi do klatki w raku piersi [106].

Pojawiają się sugestie dotyczące redukcji ęstnienia OPN na poziomie RNA. Niektórzy twierdzą, iż badania, które mają na celu poszukiwanie sposobów zahamowania wydzielania OPN mogłyby przyczynić się do spowolnienia czy zahamowania rozwoju choroby nowotworowej. Do tej pory podano dwa potencjalne sposoby wdrożenia rozwiązania tego problemu, a mianowicie poprzez rozkład rybozymów oraz hybrydyzację antysensownych oligonukleotydów. Jednakże, obie metody zawierają ograniczenia wynikające z trudności dostarczenia leku na bazie kwasu nukleinowego do poziomu wewnątrzkomórkowego. Podjęto próby inhibicji OPN przy użyciu przeciwciał oraz peptydów syntetycznych [19, 67, 106, 147].

Kolejne analizy w mojej pracy obejmują ekspresję wskaźnika CD44. Rezultaty badania własnego pozwalają na stwierdzenie związku pomiędzy ekspresją CD44 a obecnością przerzutów do klatki piersiowej. W badaniu wykazano podwyższony poziom CD44 u chorych z przerzutem do klatki piersiowej w odniesieniu do chorych z grupy kontrolnej. Analiza ekspresji CD44 wykazała podwyższone wartości wraz z zaawansowaniem choroby w skali De Walda, a w grupie I zaobserwowano na poziomie istotności statystycznej ($p < 0,04$). W moich badaniach wykazałem podwyższony poziom CD44 u chorych leczonych bifosfonianami. Korelacja ta dla ogółem chorych i dla pacjentek z przerzutami z raka piersi była na poziomie istotności statystycznej, odpowiednio $p < 0,01$ i $p < 0,05$.

Ekspresja CD44 może wykazywać odwrotną korelację z ryzykiem rozwoju przerzutów nowotworowych. Na podstawie mojego materiału wykazałem lepsze rokowanie u chorych z podwyższonym poziomem CD44 zarówno dla ogółem chorych i w poszczególnych podgrupach, jednak te zależności nie były na poziomie istotności statystycznej. W raku szyjki macicy stwierdzono, że wysoki poziom receptora CD44 hamuje powstawanie przerzutów [98]. Podobnie w raku piersi, interakcja hialuronianów CD44 chroni przed wystąpieniem przerzutów [21, 83]. W nowotworach prostaty podwyższona ekspresja CD44 sprzyja wystąpieniu przerzutów [35].

Wyniki badań przedstawione w literaturze pozwalają potwierdzić wpływ ekspresji ęsteczek CD44 jako czynnika prognostycznego i progresji raka piersi. Morris i wsp. ó 2001 wyróżniają intensyfikację amplifikacji wariantu polimorficznego V6 (typ CD44) jako negatywny czynnik prognostyczny w raku piersi [88]. Podobne uwagi można znaleźć w pracy autorstwa Sheen-Chen i wsp. ó 1999 na temat udziału antygenu CD44 w rozwoju guza

i powstawaniu przerzutów nowotworowych, w szczególności do kości [121].

Mrochem i Bartnik ó 2008 zauważają znaczącą rolę wiązania CD44 z OPN w powstawaniu przerzutów. Wiązanie to indukuje migrację komórek nowotworowych oraz inwazję tkanek [89]. Glikoproteina CD44 kontroluje transdukcję sygnału. Izoformy CD44 uczestniczą w szlakach sygnałowych, od sygnałów indukowanych przez czynnik wzrostu do szlaków regulowanych przez Wnt. Rola członków rodziny CD44 w progresji guza i przerzutach jest najprawdopodobniej związana z funkcjami różnych izoform jako centrów sygnałowych [98].

Kolejnym analizowanym wskaźnikiem biochemicznym potencjału przerzutowego w mojej pracy jest aktywator plazminowy typu urokinazowego (uPA). W badaniu własnym wykazałem obniżenie jego aktywności w porównaniu z grupą kontrolną, poza podgrupą chorych na raka prostaty z przerzutem nowotworowym. Udowodniłem istotną statystyczną różnicę wartości median uPA ze skalą De Walda ($p < 0,05$) i rozległość przerzutów w kręgosłopie ($p < 0,05$) w odniesieniu do podgrupy pacjentek z rakiem piersi. W tej analizowanej podgrupie ekspresja uPA była podwyższona wraz z zaawansowaniem zmian przerzutowych w kręgosłopie i zaawansowaniem choroby w skali De Walda. U chorych z korzystnym rokowaniem odnotowałem podwyższone wartości median uPA dla ogółu chorych i podgrupie z nowotworem nerki, natomiast w podgrupach z nowotworami piersi i prostaty mediany były obniżone (nie stwierdziłem zależności na poziomie istotności statystycznej).

Subramian i wsp. 2006 oraz Croucher i wsp. 2007 i wsp. wysunęli wniosek, iż uPA jest odpowiedzialne za powstawanie ognisk wtórnych i naciekanie siednich komórek u kobiet z rakiem piersi. Dzieje się tak na skutek degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej, zaburzenie kontroli adhezji i migracji komórek oraz aktywizacji angiogenezy [30, 135]. Qin i wsp. ó 2008 dodają, że obniżenie ekspresji inhibitora PAI-1 w połączeniu z nadekspresją uPA jest cechą charakterystyczną dla raka piersi o wolniejszym przebiegu [100].

Kolejnym poddanym analizie aktywatorem plazminogenu jest typ tkankowy tPA. Jakubiszyn i wsp. ó 2006 wyszczególniają tPA jako jeden z elementów biorących udział w powstaniu i przerzutu nowotworu. Dodają, że znacznie podwyższone stężenie PAI-1, u-PAR i tPA jest cechą charakterystyczną dla nowotworów złośliwych [65]. Dane otrzymane w badaniu własnym pokazują wpływ ekspresji tPA jako czynnika charakterystycznego dla przerzutów nowotworowych do kręgosłopa. We wszystkich badanych podgrupach wykazano wzrost ekspresji t-PA. Dla ogółu chorych z przerzutami do kręgosłopa a grupą kontrolną

wykazał zależność na poziomie istotności statystycznej ($p < 0,001$).

Chigira i Shinozaki 1990 opublikowali wyniki badań przeprowadzonych na 26 pacjentach z przerzutami do kości i 9 z guzem pierwotnym, mających na celu ustalenie ekspresji wybranych markerów. Pod uwagę wzięli tPA, CA 15-3, CA 19-9, antygen raka pęskonabłonkowego (SCA Ag), CEA, alfa-fetoprotein (AFP) i sterczowy fosfataz kwaśny (PAP). U 19 pacjentów z przerzutami do kości wykazano nadekspresję co najmniej jednego z wskaźników. Najczulszym markerem w diagnostyce i prognozowaniu zmian przerzutowych okazał się tPA. W przypadku raka piersi, oprócz tPA, najwyższą ekspresję wykazał CA 15-3 [23].

W badaniu wéśnym potwierdzono wzrost ekspresji tPA u pacjentek z rakiem piersi porównując wartości median wskaźników kaskady nowotworowej ze skalą De Walda ($p = 0,03$) i z rozległością przerzutów nowotworowych w kręgosłupie ($p < 0,04$). U wszystkich chorych, u których stosowano bifosfoniany, obserwowano spadek ekspresji tPA, a różnica w grupie I i podgrupie I.1 (przerzuty z nerki), u chorych u których stosowano i nie stosowano bifosfonianów, była na poziomie istotności statystycznej, odpowiednio $p < 0,01$ i $p < 0,05$.

Od czasu odkrycia w 1989 roku, VEGF jest uważany za najważniejszy czynnik angiogeniczny, zarówno w tkankach zdrowych, jak i stanach patofizjologicznych. Udział VEGF w przebiegu chorób nowotworowych jest opisany w wielu pracach. Kajdaniuk i wsp. ó 2011 opisują ekspresję naczyniowo-ródbłonkowego czynnika wzrostu w przebiegu nowotworów i aktywacji procesów przerzutowych, zaznaczając, że stopień ekspresji wskaźnika jest ściśle związany ze stopniem agresji guza i rokowaniem [68]. Trwają badania nad terapią antyangiogenną. Głównym założeniem terapii jest zastosowanie odpowiednich inhibitorów VEGF, które mają blokować receptory tkanek nowotworowych i przekazywanie sygnałów proangiogennych [103, 154].

W badaniu wéśnym, aktywność VEGF_{165b} należy uznać za nieoznaczalną. Woolard i wsp. 2004 zajęli się wnikliwą analizą wpływu VEGF_{165b} na procesy komórkowe. Według autorów, VEGF_{165b} hamuje aktywację receptora VEGFR-2, a tym samym obniża przepływ sygnałów VEGFR-2, aktywację MAPK i procesy angiogenezy [153].

W swojej pracy Peiris-Pages ó 2012 skupiła się m.in. na ocenie ekspresji VEGF_{165b} w nowotworach. Autorka podaje, że w badaniach przeprowadzonych na myszach, nadekspresja VEGF_{165b} była czynnikiem opóźniającym rozwój czerniaka, guza nerki, jelita i prostaty. Rekombinant ludzkiego genu rhVEGF_{165b} podany myszom zadziałał podobnie, co wskazuje na potencjalną rolę wskaźnika jako czynnika antynowotworowego. Jednakże, wydaje się być to prawdopodobne tylko w przypadku pacjentów z wysoką ekspresją VEGF. Nieustannie

trwają badania i ukazują się publikacje, w których wymienia się VEGF₁₆₅ jako czynnik antyangiogeny, którego odpowiednie wykorzystanie może stać się ważnym czynnikiem prognostycznym w przypadku powstawania i leczenia nowotworów oraz zmian przerzutowych [103]. W kontekście wyników powyższych badań obserwacje powstałe w niniejszej pracy wskazują na znaczne zaawansowanie procesu nowotworowego w ocenianej grupie chorych, u których doszło do rozwoju przerzutów. W związku z powyższym dla powstawania przerzutów istotne znaczenie wydaje się mieć całkowite zahamowanie produkcji VEGF₁₆₅. Ponadto w niniejszej pracy obserwowano tendencje do rozwoju zaburzeń w układzie krzepnięcia u chorych z całkowitym zahamowaniem produkcji VEGF₁₆₅. Nadkrzepliwość jest powszechnie znanym zjawiskiem towarzyszącym agresywnym procesom nowotworowym. Oczywiście w interpretacji powyższych obserwacji należy również uwzględnić kwestię poziomu detekcji VEGF₁₆₅. Zaawansowana choroba nowotworowa może prowadzić do tak znacznego obniżenia wytwarzania VEGF₁₆₅, że wartości jego stężenia mogą znajdować się poniżej progu detekcji stosowanych testów laboratoryjnych.

Zajmując się zagadnieniem patogenezy powstawania przerzutów do kręgosłupa, należy zwrócić uwagę na układ RANK/RANKL/OPG, którego zaburzenia równowagi są odpowiedzialne za procesy degradacji kości i osteolizy nowotworowej. Do syntetyzowanych przez nowotwór czynników pobudzających różnicowanie, namnażanie i aktywację komórek kościogubnych należą IL-1, -6, -8, -11, TNF, sRANKL, M-CSF, TGF- β , VEGF, MMP, PTH, PTH-rP i prostaglandyny [57, 111, 115, 130, 148]. Mogą one, np. IL-1, -6, -8 i TNF, stymulować osteoklastogenezę w sposób niezależny od RANKL, podczas gdy M-CSF wzmacnia wytwarzanie RANKL przez komórki podścieliska i przedłuża funkcjonowanie osteoklastów blokując ich apoptozę [5].

W badaniach własnych dotyczących osteoklastogenezy nowotworowej podwyśszon ekspresję RANK, RANKL i OPG wykazaliśmy u wszystkich chorych z przerzutami do kręgosłupa (grupa 1) i przerzutami z nerki, piersi, prostaty (podgrupy 1.1, 1.2, 1.3) w porównaniu z grupami kontrolnymi. Takiej zależności nie wykazywało aktywność RANK u pacjentek z przerzutami z piersi i aktywność RANKL u chorych na raka prostaty z przerzutami. Badania statystyczne wykazały w zakresie osteoprotegryny istotną różnicę ($p=0,01$) pomiędzy grupą I a grupą kontrolną. Również na poziomie istotności statystycznej wykazaliśmy zależność pomiędzy aktywnością RANKL u chorych na raka piersi z przerzutami nowotworowymi a grupą kontrolną.

Zang i wsp. ó 2015 przeprowadzili analizę 11 badań, mających na celu ustalenie

zależności pomiędzy ekspresją OPG a ogniskami przerzutowymi do końca w przebiegu raka prostaty i raka pęcherza. W tym celu zestawiono wyniki 3 grup chorych o pacjentów ze zmianami przerzutowymi, pacjentów bez przerzutów oraz próbki zdrowych komórek. U chorych z rakiem stercza z przerzutami do końca, poziom OPG był wyższy niż u pozostałych osób. W badaniu dotyczącym raka pęcherza, poziom OPG był wyższy u chorych z przerzutami oraz u pacjentów z nowotworem bez przerzutów, niż w grupie kontrolnej. Jednakże poziom OPG nie różnił się znacznie u chorych z przerzutami i bez [155].

W pracy wykazano zależność pomiędzy wzrostem aktywności RANK, RANKL, OPG (tylko aktywność OPG w nowotworach przerzutowych z nerki była obniżona), a zaawansowaniem choroby w skali De Walda. Istotnie na poziomie statystycznym ($p < 0,05$) stwierdzono w odniesieniu do RANKL.

Podwyższone wartości RANK zaobserwowano wraz ze stopniem zaawansowania choroby nowotworowej (skala Tokuhaschi) niezależnie od lokalizacji ogniska pierwotnego nowotworu.

Dostępne publikacje pozwalają potwierdzić wyniki otrzymane w mojej analizie, podkreślając znaczenie procesów układu RANK/RANKL/OPG związanych ze zmianami przerzutowymi do końca w przebiegu wielu nowotworów. Warto podkreślić znaczenie skomplikowanych procesów włączenia OPG/RANK/RANKL oraz rolę badań dotyczących udoskonalenia i implementacji wybranych procesów z udziałem powyższych wskaźników, w celu walki z zaburzeniami metabolicznymi dotyczącymi układu kostnego [115, 130].

W moim materiale wykazałem obniżenie aktywności RANKL u wszystkich chorych, u których była stosowana chemioterapia. Przeprowadzone obliczenia nie wykazały istotności statystycznej. Również u wszystkich analizowanych chorych leczonych bifosfonianami stwierdziłem obniżony poziom OPG, a u chorych na raka prostaty zależność pomiędzy grupami chorych leczonych bifosfonianami a nieleczonych była na poziomie istotności statystycznej ($p < 0,05$).

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach wykazałem złe rokowanie w przypadkach podwyższonych wskaźników RANK, RANKL i OPG u wszystkich analizowanych chorych i u chorych na raka prostaty z przerzutami do kręgosłupa, podobnej zależności nie wykazałem w grupach chorych na raka nerki i piersi z przerzutami do kręgosłupa. Wykazane zależności nie były na poziomie istotności statystycznej.

Weichlaus i wsp. w 2014 r. przeprowadzili badania wpływu ekspresji OPG w przerzutach w przebiegu raka piersi. Ekspresja OPG okazała się czynnikiem związanym z powstawaniem ognisk przerzutowych. Autorzy dodają, iż istnieje zależność OPG

większe si z mniejsz inwazj nowotworu [148].

Rychlik i wsp. ó 2010 starali si zbada wpów ekspresji markerów molekularnych u pacjentów z rakiem prostaty z przerzutami do ko ci. W tym celu porównali wyniki chorych z pozytywnym oraz negatywnym wynikiem bada scyntygraficznych ukadu kostnego. Do analizowanych wska ników nale a poziom ekspresji OPG, PSA, testosteronu, albuminy, globuliny wi cej hormony p iowe (SHBG) i RANKL. Badanie potwierdzi zwi kszone st enie OPG i OPG/RANKL u chorych z pozytywnym wynikiem badania scyntygraficznego. Otrzymane dane potwierdzaj osteoblastyczny charakter zmian oraz znaczenie warto ci stosunku OPG/RANKL w procesie powstawania ognisk przerzutowych w szkielecie kostnym. Im bardziej zaawansowany stopie nowotworu, tym wy sza ekspresja powy szych markerów, przy czym ekspresja OPG jest w ród nich najwi ksza [118].

Wyniki w asne, korelacji skali De Walda, wskaza na zale no pomidzy ekspresj wybranych wska ników kaskady, osteoklastogenezy nowotworowej a stanem immunologicznym chorych. Na tej podstawie, mo na stwierdzi wpów ukadu immunologicznego na aktywno markerów kaskady i osteoklastogenezy nowotworowej.

W progresji nowotworów aktywna rola przypisywana jest populacji komórek leukocytarnych. W przesz ci uwa ano, e nacieki leukocytarne w guzie maj zwi zek z odpowiedzi immunologiczn gospodarza na rozwijaj cy si nowotwór. Do infiltruj cych guz komórek leukocytarnych nale : makrofagi, neutrofile, eozynofile, komórki dendrytyczne, komórki tuczne i limfocyty [151]. Makrofagi stanowi g ówn komponent grupy leukocytów infiltruj cych guz nowotworowy. Makrofagi, komórki wywodz ce si z kr cych we krwi monocytów, s jednymi z pierwszych komórek pojawiaj cych si w miejscu infekcji i/lub zranienia. Niszcz one patogeny dzi ki wytwarzaniu reaktywnych form tlenu (reactive oxygen speccies ROS) i azotu (reactive nitrogen species RNS), a poprzez wytwarzanie cytokin i chemokin mobilizuj inne komórki ukadu immunologicznego [108].

Zgodnie z podstawowym pogl dem reaktywne formy tlenu maj ró noraki pozytywny wpów na karcinogenez i rozwój komórek nowotworowych: prowadz do uszkodzenia genomu i niestabilno ci mechanizmów genetycznych, zaburze transdukcji sygna i oraz aberracji receptorów czynników wzrostu i cz steczek adhezyjnych, wspieraj ruchliwo komórek i ksztacuj mikro rodowisko nowotworu poprzez indukowanie reakcji zapalnych, regeneracyjnych i angiogenezy. Jednak pojawiaj si liczne dowody wskazuj ce, e komórki nowotworowe równie broni si przed uszkodzeniem oksydacyjnym, aby przetrwa i skutecznie rozprzestrzenia si . Ten "heretyczny" pogl d otrzyma niedawno wa ne poparcie z bada na temat roli zdolno ci antyoksydacyjnej w komórce macierzystej

nowotworu samoodnawiającej się i odpornej na leczenie chemoterapeutykami, ale tak e aktywnie przekształcającej niektóre onkogeny związane z ich zdolnością do utrzymywania podwyższonego poziomu wewnątrzkomórkowego zredukowanego glutationu, głównego składnika buforu redoks, czy te zmiany metabolizmu komórki polegają na wytwarzanie mniej rodników tlenowych, jak w przemianie Warburga [97].

Wykazano znaczenie komórkowych zdolności antyoksydacyjnych w przerzutach, będących wynikiem złozonego programu komórkowego obejmującego zwiększoną ruchliwość komórek wraz ze zmianami w metabolizmie energetycznym. Przemiana Warburga jest obserwowana w nowotworach złośliwych, gdzie oksydacyjne uszkodzenie mitochondrialne prowadzi do zwiększonej oporności komórkowej na utleniacze. Przekształcenie cytoszkieletu leży u podstaw ruchliwości komórki i jej agresywnego zachowania [101].

Majewski ó 2017 w swojej publikacji podkreśla istotną rolę zachodzącą pomiędzy komórkami kostnymi a komórkami systemu immunologicznego. Autor objaśnia mechanizm oddziaływania receptorów i cytokin znajdujących się na komórkach odpornościowych na komórki kostne oraz opisuje istotne interakcje zachodzące pomiędzy układem RANKL-RANK-OPG a układem immunologicznym, dokumentując wpływ zachodzących reakcji na metabolizm kości oraz procesy w nich zachodzące, m.in. związane z powstawaniem zmian przerzutowych.

Podsumowując porównanie wyników badań własnych z literaturą okazuje się, że rola wybranych markerów molekularnych kaskady i osteoklastogenezy nowotworowej u chorych z przerzutami nowotworowymi, w tym do kręgosłupa, zasługuje na uwagę i wnosi implikacje do praktyki klinicznej. Wyniki badań molekularnych uzupełnieniem danych klinicznych uzyskanych z badań obrazowych i innych badań laboratoryjnych. Znalezienie odpowiednich inhibitorów dla substancji biorących udział w kaskadzie nowotworowej i osteoklastogenezie nowotworowej może doprowadzić do wykorzystania tych markerów do poszukiwania nowych strategii terapeutycznych.

Z uwagi na złożone mechanizmy kaskady nowotworowej, w ostatnim okresie dużo uwagi poświęca się terapii kombinowanej polegającej na jednoczesnym lub sekwencyjnym blokowaniu różnych ciękich sygnałowych związanych z oddziaływaniem mikrośrodowiska na komórki nowotworowe. Chociaż wiele z tych procesów wymaga jeszcze dokładniejszego wyjaśnienia, lepsze rozumienie złożonej zależności pomiędzy nowotworem a mikrośrodowiskiem pozwoli wprowadzić bardziej skuteczne terapie dla pacjentów z przerzutami nowotworowymi do kości.

Leczeniem adiuwantowym jest wprowadzenie do użyciu klinicznego leków hamujących resorpcję kości, które podnoszą stężenie OPG oraz inaktywują RANKL oraz antyresorpcyjnych (bisfosfonianów) oraz przeciwciała monoklonalne (denosumab). Bisfosfoniany, hamują dojrzewanie preosteoklastów i aktywno dojrzających osteoklastów oraz indukują ich apoptozę, przyczyniając się do redukcji zmian osteolitycznych. Zwiększają także syntezę RANKL i wzmagają wytwarzanie OPG. Ponadto bisfosfoniany nie tylko stymulują apoptozę komórek nowotworowych i zmniejszają ich proliferację, ale również wyraźnie ograniczają zdolności przerzutowe guza [5].

8. Wnioski

1. Kaskada nowotworowa u chorych z przerzutami do kręgosłupa charakteryzuje się podwyższoną aktywnością MMP2, tPA, CD44 i OPN i obniżoną aktywnością MMP9 oraz uPA. Kaskadę osteoklastogenezy nowotworowej cechuje podwyższony poziom stężeń OPG, RANK i RANKL, poza przerzutami z sutka, gdzie RANK jest obniżony i przerzutami z prostaty, gdzie nie ma wartości RANKL.
2. Badania wykazały zależność aktywności wskaźników kaskady i osteoklastogenezy nowotworowej ze skalą de Walda. Stwierdzona korelacja wykazuje wpływ stanu immunologicznego chorego na stężenie badanych wskaźników. Wraz z zawansowaniem choroby nowotworowej ocenianej w skali Tokuhaski obserwuje się podwyższone poziomy MMP9 i obniżone MMP2 i RANK. Istnieją korelacje pomiędzy aktywnością wskaźników kaskady nowotworowej a zastosowanym leczeniem onkologicznym.
3. Ocena markerów molekularnych MMP2, MMP9, tPA, OPN, RANK i RANKL u chorych z przerzutami do kręgosłupa może być przydatna w określeniu zaawansowania choroby, planowaniu i monitorowaniu leczenia.

9. Pi miennictwo

1. Achbarou A., Kaiser S., Tremblay G.: Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo. *Cancer Research* 1994, 54, 2372-2377
2. American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures*. American Cancer Society. Atlanta, Ga, USA, 2007
3. Arguello F., Baggs R.B., Duerst R.E., Johnstone L., McQueen K., Frantz C.N.: Pathogenesis of vertebral metastasis and epidural spinal cord compression. *Cancer* 1990, 65, 98-106
4. Batson O.V.: The function of the vertebral veins and their role in the spread of metastases. 1940. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1995, 312, 4-9
5. Baudhuin M., Duplomb L., Ruiz Velasco C., Fortun Y., Heymann D., Padrines M.: Key roles of the OPG/RANK/RANKL system in bone oncology. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2007, 7, 221-232
6. Bellahcene A., Castronovo V., Ogbureke K.U., Fisher L.W., Fedarko N.S.: Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008, 8, 212-226
7. Bellahcene A., Bonjean K., Fohr B.: Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circulation Research* 2000, 86, 885-891
8. Bieniasz M., Bartkowiak J., Szemraj J.: Ekspresja genów kodujących białka morfogenetyczne kości, metaloproteinazy i inhibitory metaloproteinaz w nowotworach płuc i ich znaczenie rokownicze. *Postępy Biochemii* 2008, 54, 82-90
9. Blacher S., Jost M., Melen-Lamalle L., Lund L.R., Romer J., Foidart J.M., Noël A.: Quantification of in vivo tumor invasion and vascularization by computerized image analysis. *Microvascular Research* 2008, 75, 169-178
10. Bourguignon L.Y.W.: Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2008, 18, 251-259
11. Brakebusch C., Bouvard D., Stanchi F.: Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* 2002, 109, 999-1006
12. Brown L.F., Guidi A.J., Tognazzi K., Dvorak H.F.: Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Stroma Formation in Neoplasia: Insights from In Situ Hybridization Studies. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1998, 46, 569-575
13. Bryden A.A., Hoyland J.A., Freemont A.J., Clarke N.W., George N.J.R.: Parathyroid hormone related peptide and receptor expression in paired primary prostate cancer and bone metastases. *The British Journal of Cancer* 2002, 86, 322-325
14. Bubendorf L. i wsp.: Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients. *Human pathology*, 2000, 31, 578-583

15. Budd G.T., Adamson P.C., Gupta M., Homayoun P., Sandstrom S.K., Murphy R.F., McLain D., Tuason L., Peereboom D., Bukowski R.M., Ganapathi R.: Phase I/II trial of all-trans retinoic acid and tamoxifen in patients with advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998,4,635-642
16. Cahill D.W., Kumar R.: Palliative subtotal vertebrectomy with anterior and posterior reconstruction via a single posterior approach. *Neurosurg (Spine 1)* 1999, 90, 42-47
17. Campbell P.J., Yachida S., Mudie L.J., Stephens P.J., Pleasance E.D., Stebbings L.A., Morsberger L.A., Latimer C., McLaren S., Lin M.L., McBride D.J., Varela I., Nik-Zainal S.A., Leroy C., Jia M., Menzies A., Butler A.P., Teague J.W., Griffin C.A., Burton J., Swerdlow H., Quail M.A., Stratton M.R., Iacobuzio-Donahue C., Futreal P.A.: The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* 2010,467, 1109-1113
18. Carmeliet P.: VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology* 2005, 69 (suppl 3), 4-10
19. Chang Y.S., Kim H.J., Chang J., Ahn C.M., Kim S.K., Kim S.K.: Elevated circulating level of osteopontin is associated with advanced disease state of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007, 57, 373-380
20. Chen J., Alexander S., Orr A.W.: Integrins and Their Extracellular Matrix Ligands in Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis. *International Journal of Cell Biology* Volume 2012, Article ID 853703, 12 pages. Doi:10.1155/2012/853703
21. Chen Y., Olopade OI.: MYC in breast tumor progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008, 8, 1689-1698
22. Chiao J.W., Moonga B.S., Yang Y. M.: Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption, *British Journal of Cancer* 2000, 83, 360-365
23. Chigira M., Shinozaki T.: Diagnostic value of serum tumor markers in skeletal metastasis of carcinomas. *Arch Orthop Trauma Surg* 1990, 109, 247-251
24. Chikatsu N., Takeuchi Y., Tamura Y.: Interactions between cancer and bone marrow cells induce osteoclast differentiation factor expression and osteoclast-like cell formation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000, 267, 632-637
25. Chin L.S.: Spinal Cord Injuries. Medscape. Available at <http://emedicine.medscape.com/article/793582-overview>
26. Coleman R.E., Roodman R.E., Smith A., Body K.C., Suva H., Vessella R.V.: Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clinical Cancer Research* 2006, 12, 6243-6249
27. Coman D.R., de Long R.P.: The role of the vertebral venous system in the metastasis of cancer to the spinal column; experiments with tumor-cell suspensions in rats and rabbits. *Cancer* 1951, 4, 610-618
28. Cramer S.D., Chen Z., Peehl D.M.: Prostate specific antigen cleaves parathyroid hormone-related protein in the PTH-like domain: inactivation of PTHrP-stimulated cAMP accumulation in mouse osteoblasts. *Journal of Urology* 1997,156, 526-531
29. Criscuoli M.L., Nguyen M., Eliceir B.P.: Tumor metastasis but not tumor growth is dependent on Src-mediated vascular permeability. *Blood* 2005,105,1508-1514

30. Croucher D.R., Saunders D.N., Stillfried G.E., Ranson M.: A structural basis for differential cell signaling by PAI-1 and PAI-2 in breast cancer cells. *Biochem J* 2007, 408, 203-210
31. Czeremska M., Robak T., Wierzbowska A.: Osteopontyna óbiaćo reguluj ce angiogenez i rozwój nowotworów. *Acta Haematologica Polonica* 2010, 41, 453-462
32. De Clerck Y.A.: Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *The European Journal of Cancer* 2000, 36, 1258-1268
33. De Wald R.L., Bridwell K.H., Prodromas C., Rodts M.F.: Reconstructive spinal surgery as palliation for metastatic malignancies of the spine. *Spine* 1985, 10, 21-26
34. Deryugina E.I., Quigley J.P.: Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006, 25, 9-34
35. Desai B., Rogers MJ., Chellaiah MA.: Mechanisms of osteopontin and nCD44 as metastatic principles in prostate cancer cells. *Mol Cancer* 2007, 6, 18-25
36. Dom a€T.: Ból podstawowy objaw w medycynie. Wydawnictwo Lekarskie Warszawa PZWL 1996, 29-38
37. Dvorak H.F.: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: A critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002, 20, 4368-4380
38. Eble J., Heier J.: Integrins in cancer treatment. *Curr Cancer Drug Targets* 2006, 6, 89-105
39. Egeblad M., Werb Z.: New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. *Nature Rev Cancer* 2002, 2, 161-174
40. El-Tanani M.K., Campbell F.C., Kurisetty V., Jin D., McCann M., Rudland P.S.: The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2006,17, 463-474
41. Fidler I.J., Poste G.: The őseed and soilö hypothesis revisited. *Lancet Oncol* 2008, 9, 808-814
42. Fidler I.J.: Critical factors in the biology of human cancer metastases: twenty eight G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 1990,50,6130-6138
43. Fidler I.J., Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971, 18, 1182-1186
44. Ferrara N., Henzel W.J.: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989,161, 851-858
45. Ferrara N.: From the discovery of vascular endothelial growth factor to the introduction of avastin in clinical trials - an interview with Napoleone Ferrara by Domenico Ribatti. *Int J Dev Biol* 2011,55, 383-388
46. Folkman J.: How Is Blood Vessel Growth Regulated in Normal and Neoplastia Tissue? -G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1986, 46, 467-473

47. Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *NEJM* 1971, 285, 1182-1186
48. Freemont A.J., Hoyland J.A.: Cell adhesion molecules. *Clin Mol Pathol* 1996, 49, M321-M330
49. Galasko C.S.B., Norris H.E., Crank S.: Spinal instability secondary to metastatic cancer. *J Bone Joint Surg.* 2000, 82, 570-576
50. Giachelli C.M., Steitz S.: Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biology* 2000,19, 615-622
51. Gokaslan Z.L., Chintala S.K., York J.E., Boyapati V., Jasti S., Sawaya R., Fuller G., Wildrick D.M., Nicolson G.L., Rao J.S.: Expression and role of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in human spinal column tumors. *Clin Exp Metastasis* 1998, 16, 721-728
52. Goltzman D., Karaplis A.C., Kremer R., Rabbani A.: Molecular basis of the spectrum of skeletal complications of neoplasia. *Cancer* 2000, 88, 2903-2908
53. Götte M., Yip G.W.: Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective. *Cancer Res* 2006, 66, 10233-10237
54. Greenberger J.S.: The pathophysiology and management of spine metastasis from lung cancer. *Journal of Neuro-Oncology* 1995, 23, 109-120
55. Guise T.A., Mundy G.R.: Cancer and bone. *Endocrine Reviews* 1998,19, 18-54
56. Gupta G.P., Massagué J.: Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell* 2006, 127, 679-695
57. Hall C.L., and Keller E.T.: The role of Wnts in bone metastases. *Cancer and Metastasis Reviews* 2006, 25, 551-558
58. Hart C.A., Scott L.J., Bagley S., Bryden A.A.G., Clarke N.W., Lang S.H.: Role of proteolytic enzymes in human prostate bone metastasis formation: in vivo and in vitro studies, *The British Journal of Cancer* 2002, 86, 1136-1142
59. Hart I.R., Fidler I.J.: Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res* 1980, 40, 2281-2287
60. Heldin P., Karousou E., Bernert B. i wsp.: Importance of hyaluronan-CD44 interactions in inflammation and tumorigenesis. *Connect Tissue Res* 2008, 49, 215-218
61. Honn K.V., Tang D.G.: Adhesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. *Cancer and Metastasis Reviews* 1992, 11, 353-375
62. Hynes R.O.: Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992, 69, 11-25
63. Ibrahim T., Flamini E., Mercatali L., Sacanna E., Serra P., Amadori D.: Pathogenesis of Osteoblastic Bone Metastases From Prostate Cancer. *Cancer* 2010,116,1406-1418

64. Iwanami T., Uramoto H., Nakagawa M., Shimokawa H., Yamada S., Kohno K., Tanaka F.: Clinical Significance of Epithelial-Mesenchymal Transition-Associated Markers in Malignant Pleural Mesothelioma. *Oncology* 2014,86,109-116
65. Jakubiszyn E., Dziągiel P., Zabel M.: System aktywacji plazminogenu w migracji komórek. *Postępy biologii komórki*. 2006, 22, 123-135
66. Johnson J. P.: Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer and Metastasis Reviews* 1991, 10, 11-22
67. Johnston N.I. i wsp.: Osteopontin as a target for cancer therapy. *Front Biosci* 2008, 13, 4361-4372
68. Kajdaniuk D., Marek B., Focyn W., Kos-Kudłak B.: Naczyniowo-rodzący czynnik wzrostu (VEGF) w endokrynologii i onkologii. *Endokrynologia Polska*. 2011, 62, 456-464
69. Karbownik M.S., Nowak J.Z.: Hialuronian w chorobach nowotworowych patofizjologia i perspektywy farmakoterapii. *Nowotwory* 2011, 61, 4, 380-395
70. Keerthi M., Nagendra Krishna M.J.N.: Metastasis: An Overview. *Indian Journal of Mednodent and Allied Sciences* 2013,1-3, 34-43
71. Klein C.A.: The Metastatic Cascade. *Science* 2008, 321,1785-1787
72. Kode A., Manavalan J.S., Mosialou J., Bhagat G., Rathinam C.V., Luo N., Khiabani H., Lee A., Murty V.V., Friedman R., Brum A., Park D., Galili N., Mukherjee S., Teruya-Feldstein J., Raza A., Rabadan R., Berman E., Kousteni S.: Leukaemogenesis induced by an activating b-catenin mutation in osteoblasts. *Nature* 2014, 506, 240-244
73. Kołodziejczyk J., Talar B., Olas B., Wachowicz B.: Urokinazowy aktywator plazminogenu w chorobach nowotworowych óroła, znaczenie diagnostyczne i aspekty terapii antynowotworowej. *Acta Haematologica Polonica* 2011, 42, 619-627
74. Lee Y.P., Schwarz E.M., Davies M.: Use of zoledronate to treat osteoblastic versus osteolytic lesions in a severe combined-immunodeficient mouse model. *Cancer Research* 2002, 62, 5564-5570
75. Leon P., Bignold L.P., Coghlan B.L.D., Jersmann H.P.A.: David Paul von Hansemann: Contributions to Oncology. Context, Comments and Translations. 2007 Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin. <http://download.e-bookshelf.de/download/0000/0152/97/L-G-0000015297-0002348141>
76. Lerebours F., Lidereau R.: Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002, 44, 121-141
77. Li H., Qiu Z., Li F., Wang C.: The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett* 2017, 14, 5865-5870
78. Lin R.Y., Dayananda K., Chen T.J., Chen C.Y., Liu G.C., Lin K.L., Wang Y.M.: Targeted RGD nanoparticles for highly sensitive in vivo integrin receptor imaging. *Contrast Media Mol Imaging* 2012, 7, 7-18

79. Lipton A.: Pathophysiology of bone metastases: how this knowledge may lead to therapeutic intervention. *Journal of Supportive Oncology* 2004, 2, 205-213
80. Liu B., Cui J., Sun J., Li J., Han X., Guo J., Yi M., Amizuka N., Xu X., Li M.: Immunolocalization of MMP9 and MMP2 in osteolytic metastasis originating from MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Mol Med Rep* 2016, 14, 1099-1106
81. Logan C.Y., Nusse R.: The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2004, 20, 781-810
82. Logothetis C.J., Lin S.H.: Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 2005, 5, 21-28
83. Lopez J.I., Camenisch T.D., Stevens M.V.: CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res* 2005, 65, 6755-6763
84. Lurje G., Lenz H.J.: EGFR Signaling and Drug Discovery. *Oncology* 2009, 77, 400-410
85. Majewski P.: Osteoimmunologia, czyli o wzajemnych oddziaływaniach komórek układu kostnego i odpornościowego. *Kosmos, problemy nauk biologicznych* 2017, 66, 665-675
86. Mantur M., Wojszel J.: Czynniki adhezyjne oraz ich udział w procesie zapalnym i nowotworowym. *Pol Merk Lek* 2008, 140, 177-180
87. Mendoza M., Khanna C.: Revisiting the seed and soil in cancer metastasis. *Int J Biochem Cell Biol* 2009, 41, 1452-1462
88. Morris S.F., O'Hanlon D.M., McLaughlin R.: The prognostic significance of CD44s and CD44v6 expression in Stage II breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg Oncol* 2001, 27, 527-531
89. Mrochem J., Bartnik W.: Osteopontyna – nowy marker w chorobach nowotworowych. *Współczesna Onkologia* 2008, 12, 349-353
90. Mundy G.R.: Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002, 2, 584-593
91. Mundy G.R.: Mechanisms of bone metastasis. *Cancer* 1997, 80, 1546-1556
92. Murillo A., Guerrero C.A., Acosta O., Cardozo C.A.: Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion. *Biol Res* 2010, 43, 205-224
93. Nagase H., Woessner J.F.J.: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999, 274, 21491-21494
94. Naor D., Nedvetzki S., Golan I.: CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002, 39, 527-579
95. Nathoo N., Chahlavi A., Barnett G.H.: Pathobiology of brain metastases. *J Clin Pathol* 2005, 58, 237-242

96. Nelson A.R., Fingleton B., Rothenberg M.L., Matrisian L.M.: Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology*. 2000, 18, 1135-1149
97. O'Neill L.A.J., Hardie D.G.: Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* 2013, 493, 346-355
98. Orian-Rousseau V.: CD44 acts as a signaling platform controlling tumor progression and metastasis. *Front. Immunol.*, 08 April 2015 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00154>
99. Orr F.W., Lee J., Duivenvoorden W.C.M., Singh G.: Pathophysiologic interactions in skeletal metastasis. *Cancer* 2000, 88, 2912-2918
100. Qin W., Zhu W., Hewett J.E.: uPA is upregulated by high dose celecoxib in women at increased risk of developing breast cancer. *BMC Cancer* 2008, 8, 298-306
101. Pani G., Galeotti T., Chiarugi P.: Metastasis: cancer cells escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev* 2010, 29, 351-378
102. Pantel K., Brakenhoff R.H.: Dissecting the Metastatic Cascade. *Nature* 2004, 4, 448-455
103. Peiris-Pagès M.: The role of VEGF_{165b} in pathophysiology. *Cell Adh Migr* 2012, 6, 561-568
104. Perrone G., Vincenzi B., Santini D., Verzi A., Tonini G., Vetrani A., Rabitti C.: Correlation of p53 and bcl-2 expression with vascular endothelial growth factor (VEGF), microvessel density and clinico-pathological features in colon cancer. *Cancer Lett* 2004, 208, 227-234
105. Pikor L., Thu K., Vucic E., Lam W.: The detection and implication of genome instability in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2013, 32, 341-352
106. Pio G.M., Xia Y., Piaseczny M.M., Chu J.E., Allan A.L.: Soluble bone-derived osteopontin promotes migration and stem-like behavior of breast cancer cells. *Plos one*. 2017, 12, 12-15
107. Podsypanina K., Du Y.C.N., Jechlinger M., Beverly L.J., Hambardzumyan D., Varmus H.: Seeding and Propagation of Untransformed Mouse Mammary Cells in the Lung. *Science* 2008, 321, 1841-1844
108. Pollard J.W.: Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004, 4, 71-78
109. Powell G.J., Southby J., Danks J.A.: Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites. *Cancer Research* 1991, 51, 3059-3061
110. Radzikowski C., Opolski A., Wietrzyk J.: Post py w badaniach procesu wzrostu inwazyjnego i przerzutowania. *Nowotwory* 2002, 52 (Supl. 30), 56-65
111. Rafiei S., Komarova S.V.: Molecular Signaling Pathways Mediating Osteoclastogenesis Induced by Prostate Cancer Cells. *BMC Cancer* 2013, 13, 605-612

112. Ramankulov A.; Lein, M., Kristiansen G., Meyer H.A., Loening S.A., Jung K.: Elevated plasma osteopontin as marker for distant metastases and poor survival in patients with renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007, 133, 643-652
113. Regierer R., Wolters M.P., Ufen A., Weigel I., Novopashenny C.H., Köhne H., Samonigg J., Eucker K., Possinger M.B., Wischnewsky.: An internally and externally validated prognostic score for metastatic breast cancer: analysis of 2269 patients *Annals of Oncology* 2014, 25, 3, 633-638
114. Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Schmitt F.L., Paulsson M., Lindmark-Mansson H.: The Role of Osteopontin in Tumor Progression and Metastasis in Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007,16, 1087-1097
115. Roodman G.D.: Mechanisms of bone metastasis. *The New England Journal of Medicine* 2004, 350, 1655-1698
116. Roodman G.D.: Role of stromal-derived cytokines and growth factors in bone metastasis. *Cancer* 2003, 97, 733-738
117. Rosol T.J.: Pathogenesis of bone metastasis: role of tumor related proteins. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000,15, 844-850
118. Rychlik U., Tarapacz J., Jaszczynski J., Kulpa J.K.: Osteoprotegeryna, RANKL i PSA u chorych na raka stercza z przerzutami do kości. *Journal of Laboratory Diagnostics*. 2010, 46, 117-123
119. Samatov T.R., Tonevitsky A.G., Schumacher U.: Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Molecular Cancer* 2013, 12,107 <http://www.molecular-cancer.com/content/12/1/107>
120. Santini D., Procopio G., Porta C., Ibrahim T., Barni S., Mazzara C., Fontana A., Berruti A., Berardi R., Vincenz B.: Natural history of malignant bone disease in renal cancer: Final results of an italian bone metastasis survey. *PLoS ONE* 2013, 8, e83026
121. Sheen-Chen S.M., Chen W.J., Eng H.L., Sheen C.C., Chou F.F., Cheng Y.F.: Evaluation of the prognostic value of serum soluble CD44 in patients with breast cancer. *Cancer Invest* 1999, 17 581-585
122. Senger D.R., Ledbetter S.R., Claffey K.P. i wsp.: Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving α 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am Journ Pathol* 1996, 149, 293-305
123. Senger D.R., Wirth D.F., Hynes R.O.: Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* 1979, 16, 885-893
124. Scanlone E.F.: The Process of Metastasis. *Cancer* 1985, 55,1163-1166
125. Scatena M., Almeida M., Chaisson M.L. i wsp.: NF-kappaB mediates α v beta 3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 1998, 141, 1083-1093

126. Schaberg J., Gainor B.J.: A profile of metastatic carcinoma of the spine. *Spine* 1985, 10,19-20
127. Siclari V.A., Guise T.A., Chirgwin J.M.: Molecular interactions between breast cancer cells and the bone microenvironment drive skeletal metastases. *Cancer and Metastasis Reviews* 2006, 25, 621-633
128. Smocovitis V.B.: The *Drosophila*: E. B. Babcock, the Genus *Crepis*, and the Evolution of a Genetics Research Program at Berkeley, 1915-1947. *Hist Stud Nat Sci* 2009,39, 300-355
129. Stamenkovic I.: Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 2000, 10, 415-433
130. Stanisławski M., Kmiec Z.: Udział RANK, RANKL i OPG w osteolizie towarzyszącej nowotworom. *Postępy Hig Med Do w* 2009, 63,234-241
131. Starska K., Stasińska O., /ukomski M., Lewy-Trenda I.: Korelacja ekspresji metaloproteinazy błonowej macierzy zewnątrzkomórkowej typu I (MT1-MMP) we froncie nacieku nowotworowego z cechami kliniczno-morfologicznymi w raku piersi. *Pol Merk Lek* 2007, 135, 188-191
132. Szczeklik A.: (red.) Choroby wewnętrzne. Przyczyny, rozpoznanie i leczenie, tom I. Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, 2005
133. Suarez-Carmona M., Lesage J., Cataldo D., Gilles Ch.: EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular oncology* 2017. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12095>
134. Su X., Chakravarti D., Flores E.R.: p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2013, 13, 136-143
135. Subramanian R., Gondi Ch.S., Lakka S.S., Jutla A., Rao J.S., Jasti S.: siRNA-mediated Simultaneous downregulation of uPA and its receptor inhibits angiogenesis and invasiveness triggering apoptosis in breast cancer cells. *Int J Oncol* 2006, 28, 831-839
136. Sundaresan N., Steinberger A.A., Moore F., Sachdev V.P., Krol G., Hough L., Kelliher K.: Indications and results of combined anterior - posterior approaches for spine tumor surgery. *J Neurosurg* 1996, 85, 438-446
137. Tarin D.: Cell and tissue interactions in carcinogenesis and metastasis and their clinical significance. *Seminars in Cancer Biology* 2011, 21,72-82
138. Tauro M., Shay G., Sansil S.S., Laghezza A., Tortorella P., Neuger M., Soliman H., Lych C.C.: Bone-seeking matrix metalloproteinase-2 inhibitors prevent bone metastatic breast cancer growth. *Mol Cancer Ther* 2017, 16, 494-505
139. Thielemann A., Koczyński Z.: Zaburzenia układu fibrynolitycznego u chorych na raka. *Nowiny Lekarskie* 2012, 81, 2, 164-169
140. Thompson E.W., Newgreen D.F., Tarin D.: Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res* 2005, 65, 5991-5995

141. To T.T., Witten P.E., Renn J., Bhattacharya D., Huysseune A., Winkler C.: Rankl-induced osteoclastogenesis leads to loss of mineralization in a medaka osteoporosis model. *Development* 2012, 139, 141-150
142. Togawa D., Lewandrowsky K.U.: The pathophysiology of spinal metastases in Cancer in the Spine. R. F. McLain, Ed. *Current Clinical Oncology* 2006, 17-23
143. Tokuhashi Y., Matsuzaki H., Oda H., Oshima M., Ryu J.: A revised scoring system for preoperative evaluation of metastatic spine tumor prognosis. *Spine* 2005, 30, 2186-2191
144. Veikkola T., Karkkainen M., Cleasson-Welsh L., Alitalo K.: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000, 60, 203-212
145. Wang J., Ren Y., Guo X., Cheng H., Ye Y., Qi J., Yang C., You H.: Alterations in enhancer of zeste homolog 2, matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression are associated with ex vivo and in vitro bone metastasis in renal cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2015, 11, 3585-3592
146. Wang X.X., Denhardt D.T.: Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2008,19, 333-345
147. Weber GF.: The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1552, 61-85
148. Weichhaus M., Segaran P., Renaud A., Geerts D., Connelly L.: Osteoprotegerin expression in triple-negative breast cancer cells promotes metastasis. *Cancer Med* 2014, 3, 1112-1125
149. Weiss L., Haydock K., Pickren J. W., Lane W. W.: Organ vascularity and metastatic frequency. *The American Journal of Pathology* 1980, 101-114
150. Wieczorek K., Niewiarowska J.: Macierzyste komórki nowotworowe. *Postępy Hig Med Do w* 2012, 66, 629-636
151. Wideć M.S., Wideć M.: Mechanizmy przerzutowania i molekularne markery progresji nowotworów złośliwych. I. Rak jelita grubego. *Postępy Hig Med Do w* 2006, 60, 453-470
152. Wise J.J., Fischgrund J.S., Herkowitz H.N., Montgomery D., Kurz L.T.: Complication, survival rates, and risk factors of surgery for metastatic disease of the spine. *Spine* 1999, 24, 1943-1951
153. Woodward E., Jagdev S., McParland L., Clark K., Gregory W., Newsham A., Rogerson S., Hayward K., Selby P., Brown J.: Skeletal complications and survival in renal cancer patients with bone metastases. *Bone* 2011, 48, 160-166
154. Woolard J., Wang W.Y., Bevan H.S., Qiu Y., Morbidelli L., Pritchard-Jones R.O., Cui T.G., Sugiono M., Waive E., Perrin R., Foster R., Digby-Bell J., Shields J.D., Whittles C.E., Mushens R.E., Gillatt D.A., Ziche M., Harper S.J., Bates D.O.: VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004, 64, 7822-7835

155. Zang L., Ma M. J., Qiu H., Huang B., Chu T.: The effects of lung and prostate cancer bone metastasis on serum osteoprotegerin levels: a meta-analysis. *Sci Rep* 2015, 5, 18324
156. Zhao H., Chen Q., Alam A., Cui J., Suen K.C., Soo A.P., Eguchi S., Gu J., Ma D.: The role of osteopontin in the progression of solid organ tumor. *Cell Death Dis* 2018, 9, 356
157. Zigrino P., Loffek O., Mauch C.: Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie* 2005, 87, 321-328
158. Yin J.J., Pollock C. B., Kelly K.: Mechanisms of cancer metastasis to the bone. *Cell Research* 2005, 15, 57-62
159. Yin J.J., Selander K., Chirgwin J.M.: TGF- β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *Journal of Clinical Investigation* 1999, 103, 197-206

10. Streszczenie

Struktury kostne kręgosłupa są częstszym miejscem przerzutów nowotworowych do szkieletu kostnego. Przerzuty nowotworowe do kręgosłupa są diagnozowane najczęściej w przebiegu raka piersi, gruczołu krokowego, nerki, pęcherza i tarczycy. Stwierdzenie przerzutów, w kręgosłupie pogarsza rokowanie. Z uwagi na niezadowalające wyniki leczenia chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa został podjęty temat analizy zjawisk molekularnych związanych z kaskadą przerzutu nowotworowego i osteoklastogenezy nowotworowej.

Do celów rozprawy należą: 1. Ustalenie profilu wskaźników biochemicznych kaskady i osteoklastogenezy nowotworowej charakterystycznych dla przerzutów nowotworowych do kręgosłupa z poszczególnych narządów. 2. Korelacja aktywności markerów biochemicznych z wynikami badań klinicznych i skalami klinimetrycznymi. 3. Poszukiwanie implikacji klinicznych.

Badania zostały wykonane u chorych leczonych z powodu przerzutów nowotworowych do kręgosłupa w latach od 2014 do 2016. Badaniami objęto 75 chorych, 38 kobiet i 37 mężczyzn, w wieku od 35 lat do 83 lat. Średnia wieku wynosiła 64 lata. Pierwsza grupa badawcza obejmowała 60 osób, z przerzutem do kręgosłupa i ustalonym ogniskiem pierwotnym (nerka, piersi, prostata, ognisko pierwotne w innym narządzie). Druga grupa stanowiła 15 chorych ze zdiagnozowanym ogniskiem pierwotnym (nerka, piersi, prostata), przed jego operacją, bez obecności przerzutów do kręgosłupa.

U wszystkich osób włączonych do badania przeprowadzono badanie neurologiczne, dokonano oceny nasilenia bólu w skali (VAS) i oceny klinimetrycznej (skala De Wald, skala Tomita, skala Frankla). Ocena stanu chorego została ustalona na podstawie wyników badań laboratoryjnych krwi. Zostały zbadane we krwi wskaźniki biochemiczne kaskady nowotworowej, odzwierciedlające aktywność proteolityczną, degradację macierzy zewnątrzkomórkowej, migracji, proliferacji i zdolności do angiogenezy (osteopontyna ó OPN, różniczkowy czynnik wzrostu naczyń - VEGF 165b, receptor ó glikoproteina transmembrana ó CD44, urokinazowy aktywator plazminogenu - uPA, tkankowy aktywator plazminogenu ó tPA, metaloproteinaza 2 i 9 - MMP2 i -9). Przeprowadzono te badania układowo RANK/RANKL/OPG regulujące osteoklastogenezę nowotworów. Wynik leczenia został ustalony po 12 miesiącach od przeprowadzonych badań.

1. Kaskada nowotworowa u chorych z przerzutami do kręgosłupa, niezależnie od lokalizacji ogniska pierwotnego, charakteryzuje się podwyższoną aktywnością MMP2, tPA, CD44 i OPN i obniżoną aktywnością MMP9 oraz uPA. Podobnie zależność stwierdzono w zakresie aktywności MMP9, MMP2 i tPA w odniesieniu do przerzutów z nerki, piersi i prostaty. Kaskadę osteoklastogenezy nowotworowej u pacjentów z przerzutami do kręgosłupa, niezależnie od ogniska pierwotnego, cechuje podwyższony poziom stężenia RANK, RANKL i OPG. Nie stwierdzono takiej zależności w przerzutach nowotworowych z piersi w zakresie aktywności RANK, która była obniżona i z prostaty w zakresie RANKL, która też była obniżona.
2. Badania wykazały zależność aktywności wskaźników kaskady i osteoklastogenezy nowotworowej w odniesieniu do skali de Walda. Stwierdzona korelacja wykazuje wpływ stanu immunologicznego chorego na stężenie badanych wskaźników. Aktywność wszystkich wskaźników kaskady nowotworowej była podwyższona u chorych z immunosupresją. W badaniach przeprowadzonych w zakresie osteoklastogenezy nowotworowej zależność była podobna. Podwyższone wartości stwierdzono w zakresie RANK, RANKL i OPG u pacjentów z immunosupresją (tylko w przerzutach nowotworowych z nerki wartości OPG były obniżone).

Podwyższone wartości OPN stwierdzono w przypadkach rozległych przerzutów w kręgosłupie i ich obecność w szkieletie kostnym. Spadek aktywności RANKL odnotowano wraz z rozległymi przerzutami w kręgosłupie, a spadek stężenia OPG u chorych z obecnością przerzutów w szkieletie kostnym. Wraz z zaawansowaniem choroby nowotworowej ocenianej w skali Tokuhashi obserwowano podwyższone poziomy MMP9 i obniżone MMP2 i RANK. Korelacja pomiędzy aktywnością wskaźników kaskady nowotworowej a zastosowanym leczeniem onkologicznym też wykazała zależność. Obserwowano po leczeniu onkologicznym spadek stężenia MMP9 i tPA w przerzutach z nerki do kręgosłupa, a spadek stężenia tPA i OPN w przerzutach nowotworowych z piersi.
3. Wykazany związek pomiędzy analizowanymi biomarkerami kaskady nowotworowej i osteoklastogenezy nowotworowej, a stopniem immunosupresji wskazuje na konieczność oceny stanu immunologicznego chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa. Oznaczenia markerów molekularnych we krwi może być przydatne w ocenie stanu chorego, ustaleniu planu i monitorowaniu leczenia. Z przeprowadzonych analiz najbardziej przydatnymi markerami kaskady nowotworowej są markery MMP2, MMP9, tPA, OPN, a kaskady osteoklastogenezy nowotworowej RANK i RANKL.

11. Summary

Bone structures of the spine are a frequent place of metastases to the skeletal system. Spinal metastases are most often diagnosed in the course of breast cancer, prostate cancer, kidney cancer, lung cancer and thyroid cancer. Spinal metastases worsen the prognosis of the patient. Due to dissatisfactory results of treatment of patients with tumor metastases to the spine, the subject of analysis of molecular phenomena related to the cascade of tumor metastases and tumor osteoclastogenesis was taken.

The aims of the dissertation are: 1. Determining the profile of biochemical indicators of the cascade of tumor metastases and tumor osteoclastogenesis characteristic for spinal metastases from particular organs 2. Establishing the correlation between biochemical markers, clinical trial results and clinimetric scales 3. Searching for clinical implications.

The study was carried out on a group of patients with spinal metastases between 2014-2016. The group consisted of 75 patients, including 38 women and 37 men, aged from 35 to 83 yrs. The average age was 64 years. The first research group included 60 people with metastases people with to the spine and a fixed primary disease outbreak (from kidney, breast, prostate, other organs). The second group consisted of 15 patients with diagnosed primary disease outbreak (kidney, breast, prostate), before the surgery, without the presence of spinal metastases. In all the subjects included in the study, a neurological examination was performed

in order to assess severity of pain in VAS scale and clinimetric scales (De Wald scale, Tomita scale, Frankel scale). The patient's condition assessment was specified on the basis of the results of laboratory blood tests. Biochemical indicators of the tumor cascade were examined using the blood test in order to reflect proteolytic activity, extracellular matrix degradation, migration, proliferation and angiogenesis ability (osteopontin ó OPN, vascular endothelial growth factor ó VEGF 165b, receptor - transmembrane glycoprotein ó CD44, urokinase plasminogen activator ó uPA, tissue plasminogen activator ó tPA, metalloproteinase 2 and 9 ó MMP2 and - 9). The RANK/RANKL/OPG system regulating tumor osteoclastogenesis was also tested. The treatment results were determined 12 months after the biochemical tests.

Cancer cascade in patients with spinal metastases is characterized by increased activity of MMP2, tPA, CD44 and OPN and decreased activity of MMP9 and uPA. A similar relationship was found in the range of activity of MMP9, MMP2, and tPA with respect to the metastases from renal, breast and prostate cancer. The cascade of tumor osteoclastogenesis in patients with spinal metastases is characterized by raised levels of OPG, RANK and RANKL

concentrations. There was no such relationship in breast cancer metastases in the range of RANK activity, which was reduced and from prostate cancer in the scope of RANKL, which was also reduced.

The study have shown the relationship between the activity of the cascade of tumor metastases and tumor osteoclastogenesis with de Wald scale. The correlation shows the impact of the patient's immune system condition on the concentration of examined biochemical indicators. The activity of all cancer cascade indicators was increased in patients with immunosuppression. Research conducted in the range of tumor osteoclastogenesis showed similiar outcomes. RANK, RANKL and OPG concentration levels were elevated in patients with immunosuppression (OPG was decreased solely in patients with metastases from renal cancer).

Elevated OPN values were found in cases of extensive metastases in the spine and their presence in the skeletal system. Decrease in RANKL activity was noted along with the extent of spinal metastases and the decrease in OPG concentration in patients with skeletal system metastases. Along with the tumor advancement, assessed with Tokuhaschi scale, increased levels of MMP9 and decreased levels of MMP2 and RANK were found.

The correlation between the activity of cancer cascade indicators and the applied oncological treatment demonstrated dependencies. The decrease in MMP9 and tPA in metastases from kidney cancer was noticed. Also, the decrease in tPA and OPN was observed in metastases from breast tumor.

The relationship between the scrutinized biomarkers of the tumor cascade, tumor osteoclastogenesis and the degree of immunosuppression indicates the need to assess the immune system of patients with spinal metastases. Determination of molecular markers in the blood may be useful in assessing the patient's condition, setting a plan and monitoring treatment. The analysis proved the evaluation of MMP2, MMP9, tPA, OPN, RANK and RANKL concentration levels to be very handy.

12. Załączniki

12.1. Informacja o badaniu

INFORMACJA DLA PACJENTA

Temat badania:

Analiza stężenia we krwi wybranych markerów molekularnych u chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa.

Wprowadzenie:

Zapraszamy Pani /Pana do uczestnictwa w badaniu naukowym. Zanim zdecyduje się Pani/Pan na udział w tym badaniu, chcielibyśmy wyjaśnić, jakie są powody jego przeprowadzenia i na czym będzie ono polegało. Wszelkie wątpliwości wyjaśni Pani/Panu lekarz.

Prognozowanie przebiegu choroby nowotworowej i optymalizacja leczenia opiera się głównie na dokładnym określeniu stopnia zaawansowania klinicznego choroby. Wykorzystujemy najnowsze metody leczenia: chemioterapię, radioterapię i leczenie chirurgiczne, które skutecznie pomogą wielu pacjentom.

Bardziej dogłębne zrozumienie zjawisk odpowiedzialnych za postęp choroby i poznanie molekularnych markerów inwazyjności może być przydatne nie tylko do udoskonalenia diagnostyki i prognozowania przebiegu choroby, ale także do opracowania leków ścielonych, skierowanych wybiórczo w stosunku do czynników odpowiedzialnych za inwazyjność nowotworów, oraz do wdrożenia nowych schematów leczenia choroby. Prowadzone przez nas badania mają przyczynić się do skuteczniejszego leczenia.

Dlaczego wybrano Pani /Pana do badania?

Jest Pani/Pan w trakcie leczenia z powodu choroby nowotworowej, dlatego możemy być Pani/Panem włączony/y do badania.

Zasady badania:

Postępowanie diagnostyczne będzie oparte na rutynowych badaniach przeprowadzonych w szpitalu i uzależnione będzie od Pani/Pana choroby i stopnia jej zaawansowania. Zostanie od Pani/Pana pobrane do badania 10 ml krwi żyłnej.

Ochrona danych osobowych:

Dane osobowe w czasie badania będą traktowane zgodnie z obowiązującą na terenie Rzeczypospolitej Polskiej Ustawą o Ochronie Danych Osobowych (Dz.U. 97.133.883) oraz Rozporządzeniem 8 Ustawy o Ochronie Danych Osobowych w Unii Europejskiej z 1998 roku.

Kontakt z lekarzem:

W przypadku jakichkolwiek wątpliwości proszę skontaktować się z lekarzem:

Imię i nazwisko: Jeremi Kociński
Numer telefonu: 607-715-837

12.2. Zgoda chorego na badanie

Temat badania:

Analiza stężenia we krwi wybranych markerów molekularnych u chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa.

Imię i nazwisko pacjenta:

Data urodzenia:

1. Potwierdzam, że zapoznałem/ęm się z treścią informacji dla pacjenta (wersja z dnia 30. 01. 2014), dotyczącej powyższego badania i mam/ęm możliwość zadania pytań.

.....

2. Przyjmuję do wiadomości, że moje uczestnictwo jest dobrowolne i że mogę się wycofać z badania w dowolnym momencie, bez podania powodu, co nie wpłynie na opiekę medyczną nad mną ani moje prawa.

.....

3. Przyjmuję do wiadomości, że do moich danych dotyczących badania będą mieli wgląd jedynie lekarze uczestniczący w nim. Udzielam tym osobom pozwolenia na wgląd do mojej dokumentacji medycznej.

.....

4. Wyrażam zgodę na udział w powyższym badaniu.

.....

5. Wyrażam zgodę na pobranie 10 ml krwi żyłnej.

Í
.....

.....
Imię i nazwisko pacjenta

.....
Data

.....
Podpis

12.3. Zgoda Komisji Bioetycznej



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Maius
ul. Fredry 10
61-701Poznań

tel. (+48 61) 854 62 51, 854 60 60
fax. (+48 61) 854 61 07
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 145/14

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. 2011, Nr 277, poz. 1634 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz.480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (Dz. U. z 2004r. Nr 53, poz. 533 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małych dzieci (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1100); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. 2010r. nr 222 poz. 1453, z późn. zm.); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. 2010r. nr 107 poz. 679, z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (Dz. U. 2011 nr 82 poz. 451); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 489); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu wiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznym z Udziałem Ludzi.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu **13 lutego 2014 r.**
rozpatrzyła wnioszek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu:

dr hab. Roman Jankowski

Miejsce prowadzenia badań:

Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii UM w Poznaniu

Główny badacz: **lek. med. Jeremi Kościński**

Członkowie zespołu

badawczego:

dr Bartosz Sokół

dr hab. Rodryg Ramlau prof. UM

dr hab. Sławomir Michalak

Temat badań:

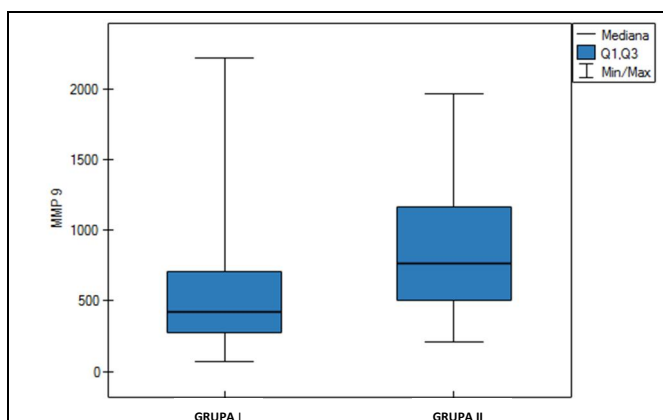
„Analiza poziomu stężenia we krwi wybranych markerów molekularnych u chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

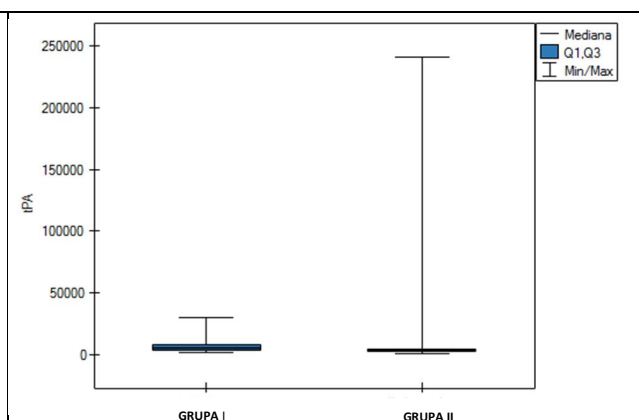
Przewodniczący Komisji

prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

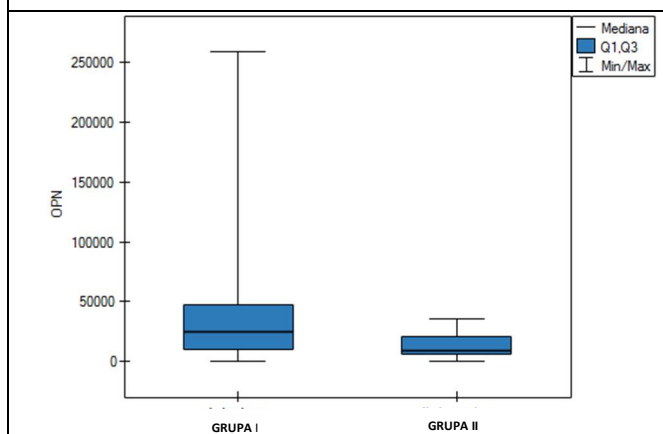
12.4. Wykaz rycin cytowanych w rozdziale 5. Wyniki bada



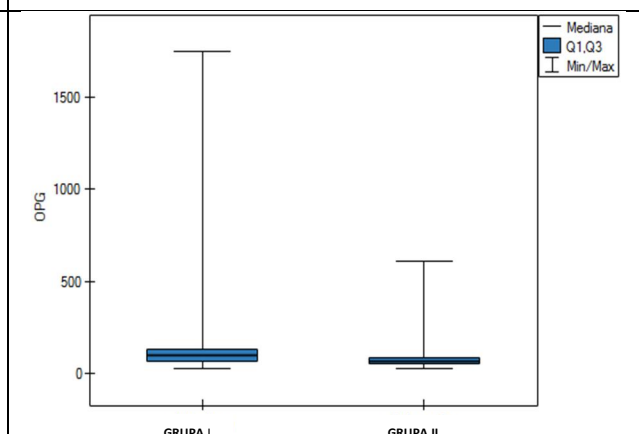
Rycina 5. Zale no pomi dzy ekspresj MMP9 u chorych z przerzutami nowotworowymi do kr goscpa, a grup kontroln .



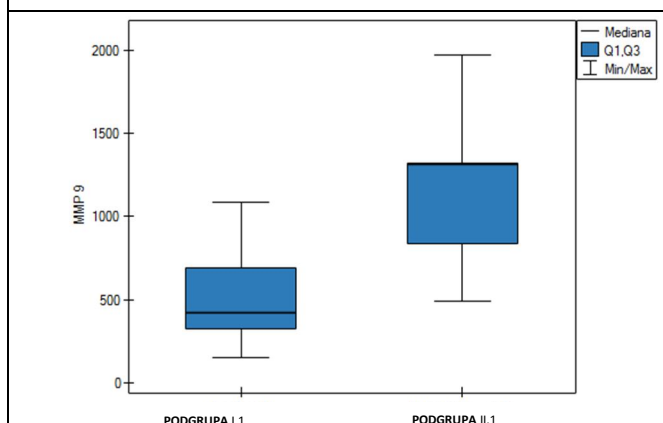
Rycina 6. Zale no pomi dzy ekspresj tPA u chorych z przerzutami nowotworowymi do kr goscpa, a grup kontroln .



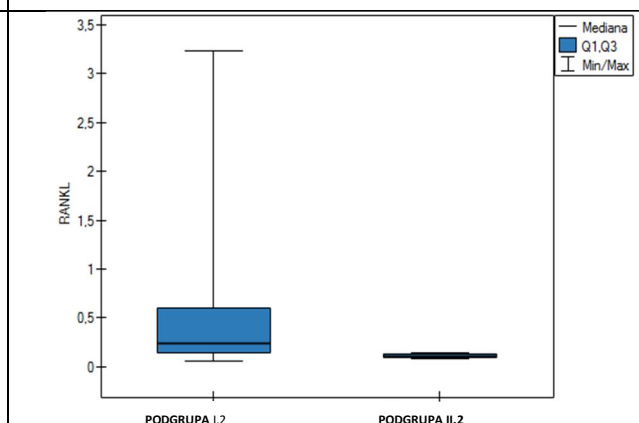
Rycina 7. Zale no pomi dzy ekspresj OPN u chorych z przerzutami nowotworowymi do kr goscpa, a grup kontroln .



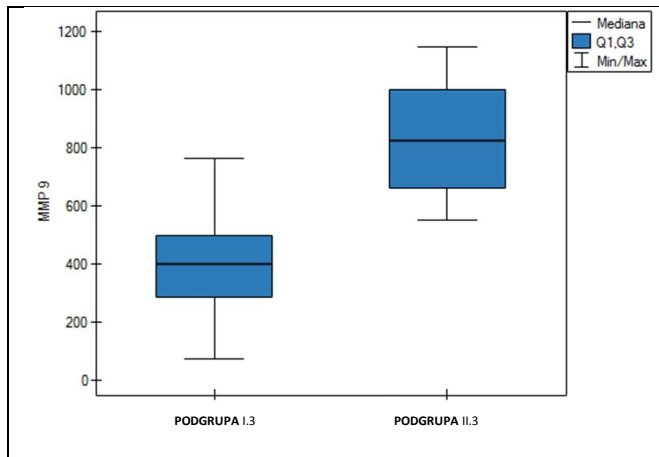
Rycina 8. Zale no pomi dzy ekspresj OPG u chorych z przerzutami nowotworowymi do kr goscpa, a grup kontroln .



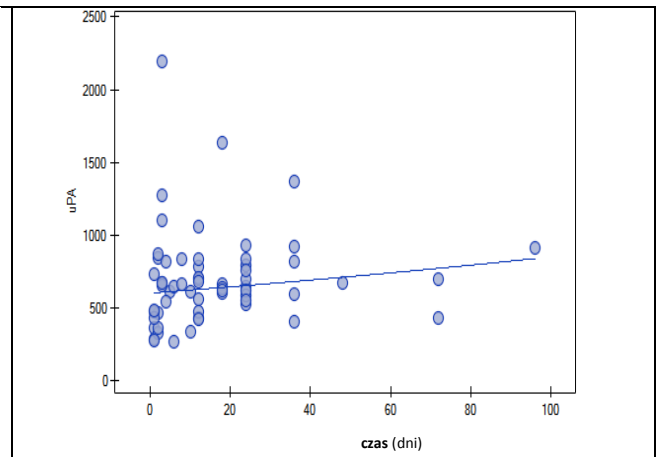
Rycina 9. Zale no pomi dzy ekspresj MMP9 u chorych na raka nerki z przerzutami nowotworowymi do kr goscpa a podgrup kontroln .



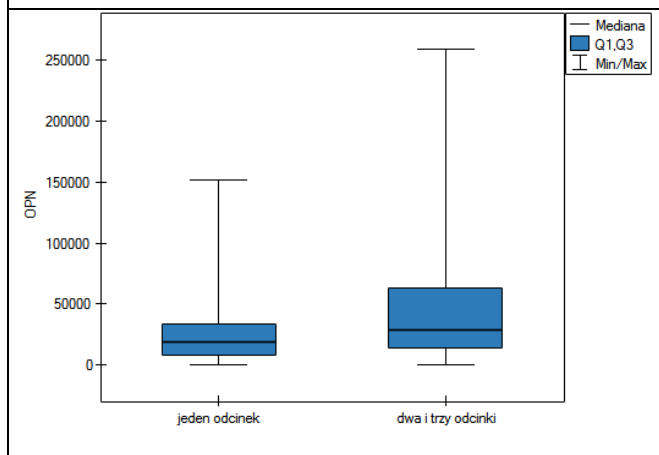
Rycina 10. Zale no pomi dzy medianami wska nika RANKL u chorych na raka piersi z przerzutami nowotworowymi do kr goscpa a grup kontroln .



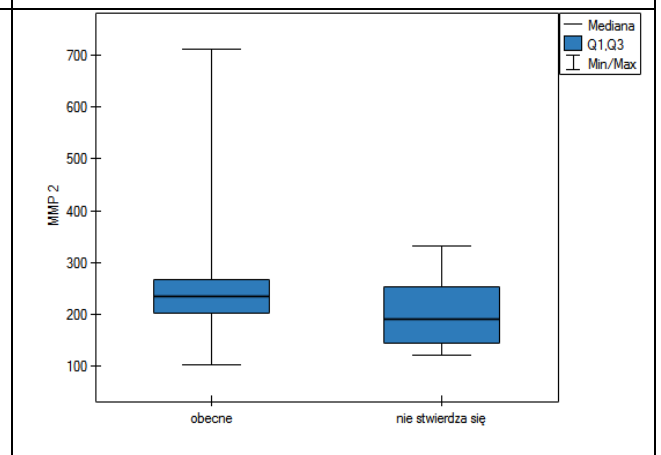
Rycina 11. Zależność pomiędzy ekspresją MMP9 u chorych na raka prostaty z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa a podgrupą kontrolną.



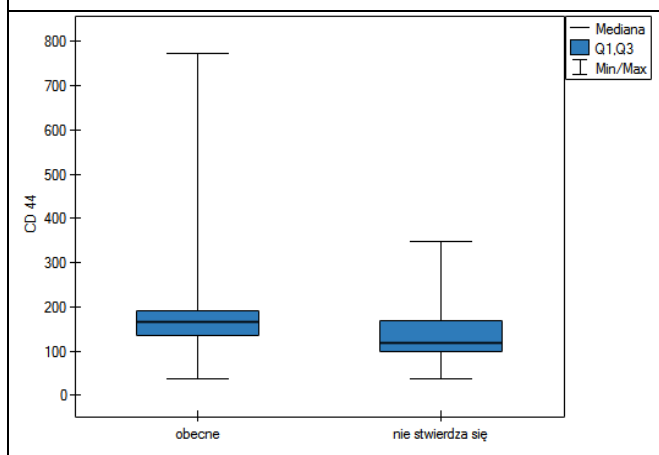
Rycina 12. Zależność pomiędzy ekspresją uPA a czasem od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa.



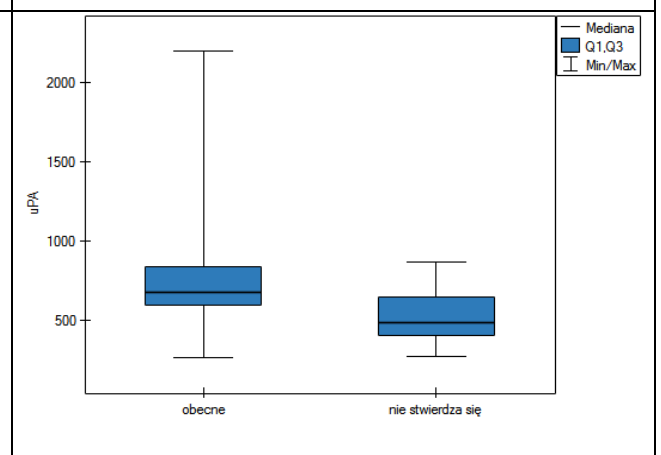
Rycina 13. Zależność pomiędzy ekspresją OPN, a rozległością zmian nowotworowych w kręgosłupie.



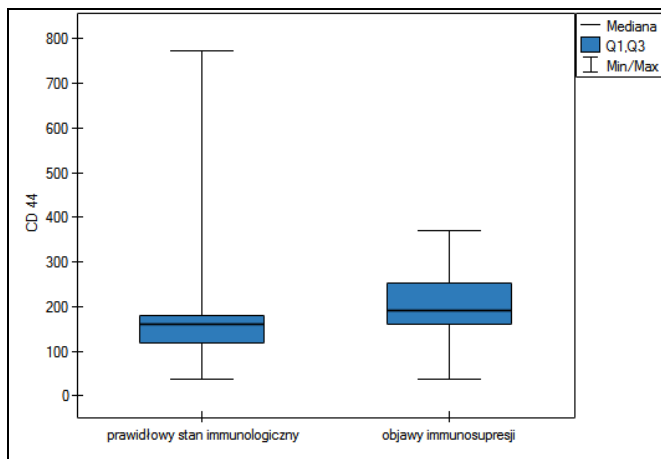
Rycina 14. Zależność pomiędzy ekspresją wskaźnika MMP2, a obecnością przerzutów w szkieletach kostnych.



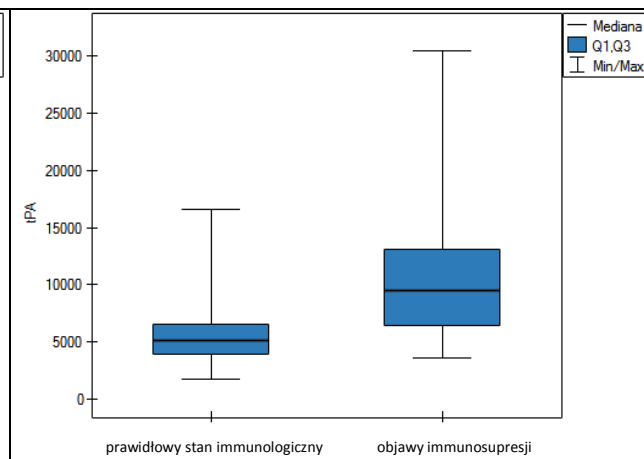
Rycina 15. Zależność pomiędzy ekspresją CD44, a obecnością przerzutów w szkieletach.



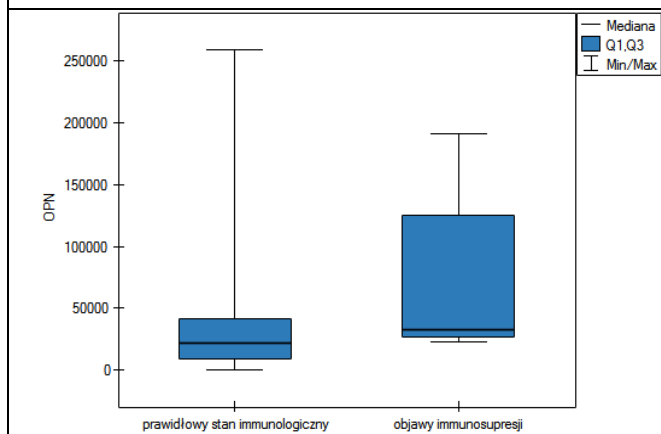
Rycina 16. Zależność pomiędzy ekspresją uPA, a obecnością przerzutów w szkieletach kostnych.



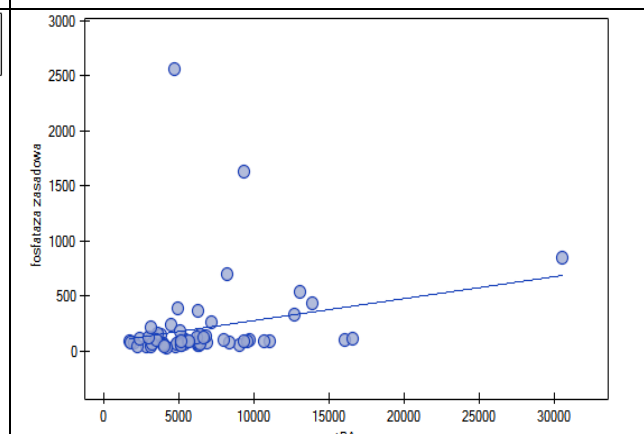
Rycina 17. Zależność pomiędzy ekspresją CD44, a stanem immunologicznym chorego.



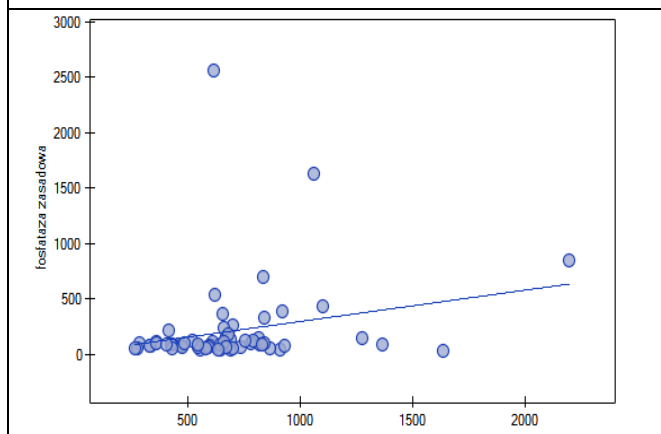
Rycina 18. Zależność pomiędzy ekspresją tPA, a stanem immunologicznym chorego.



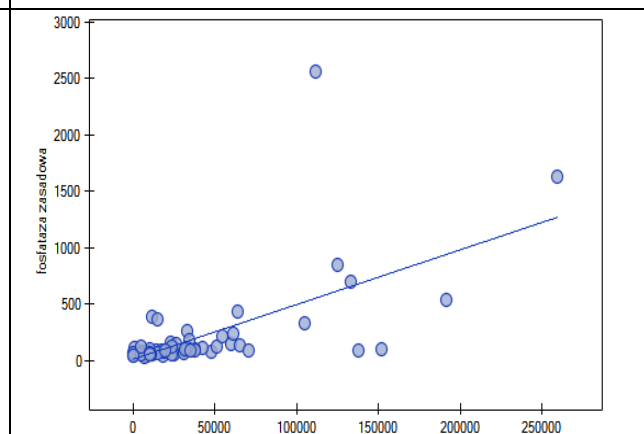
Rycina 19. Zależność pomiędzy ekspresją OPN, a stanem immunologicznym chorego.



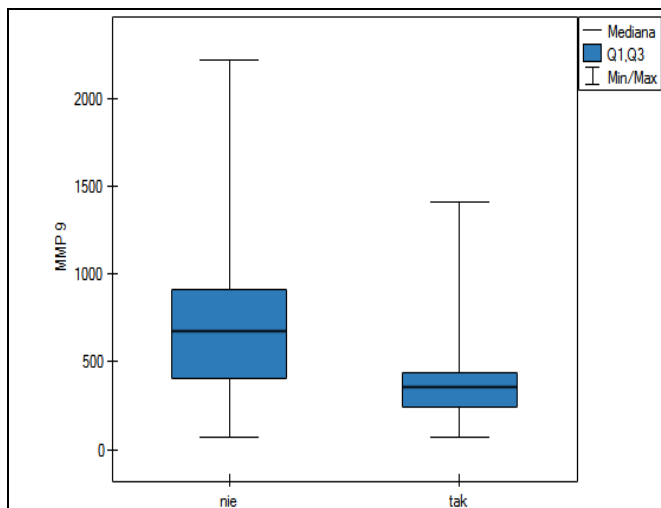
Rycina 20. Korelacja pomiędzy poziomami fosfatazy zasadowej, a ekspresją tPA.



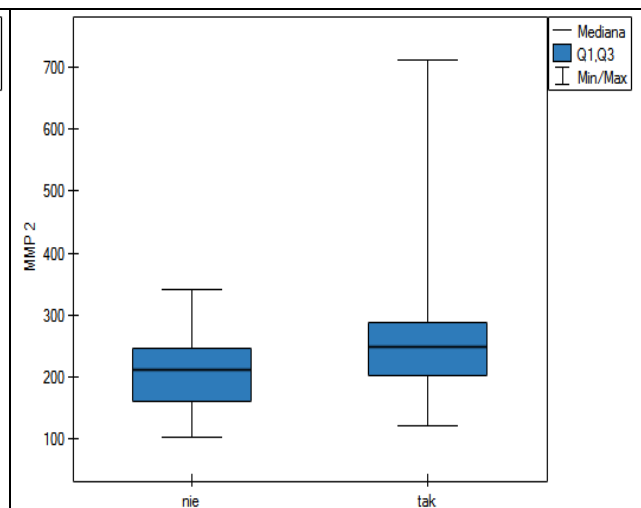
Rycina 21. Korelacja pomiędzy poziomem fosfatazy zasadowej, a ekspresją uPA.



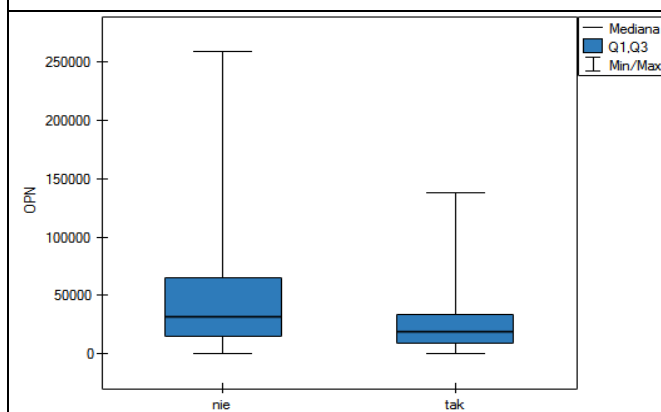
Rycina 22. Korelacja pomiędzy poziomami fosfatazy zasadowej, a ekspresją OPN.



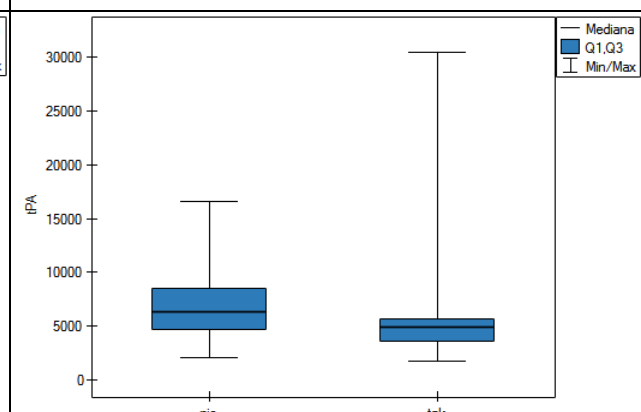
Rycina 23. Zależność pomiędzy ekspresją MMP9, a zastosowaniem radioterapii.



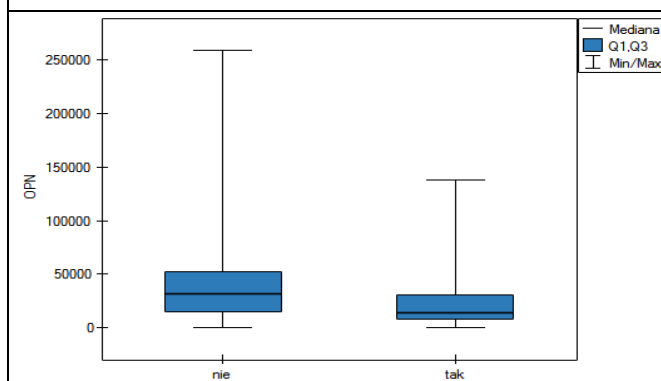
Rycina 24. Zależność pomiędzy ekspresją MMP2 a zastosowaniem radioterapii



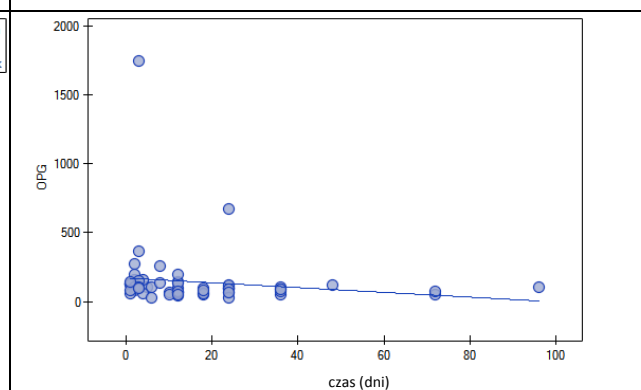
Rycina 25. Zależność pomiędzy ekspresją OPN, a zastosowaniem radioterapii.



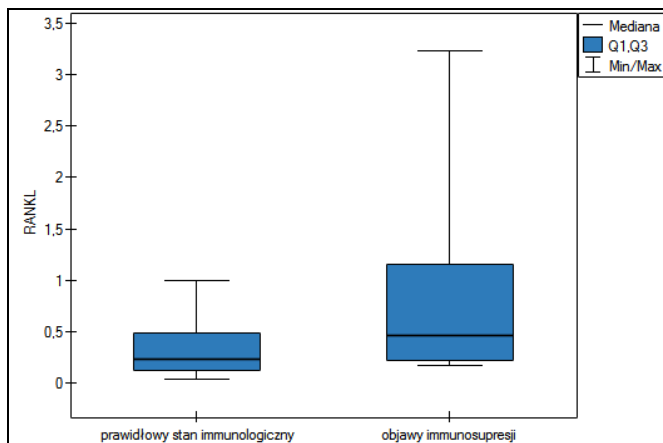
Rycina 26. Zależność pomiędzy ekspresją tPA a zastosowaniem bifosfonianów.



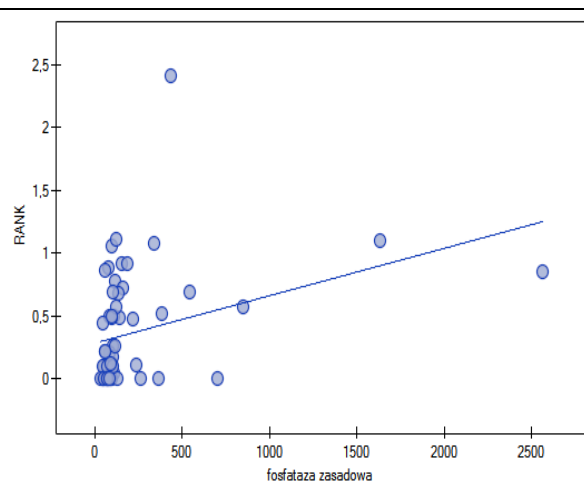
Rycina 27. Zależność pomiędzy ekspresją OPN a zastosowaniem bifosfonianów.



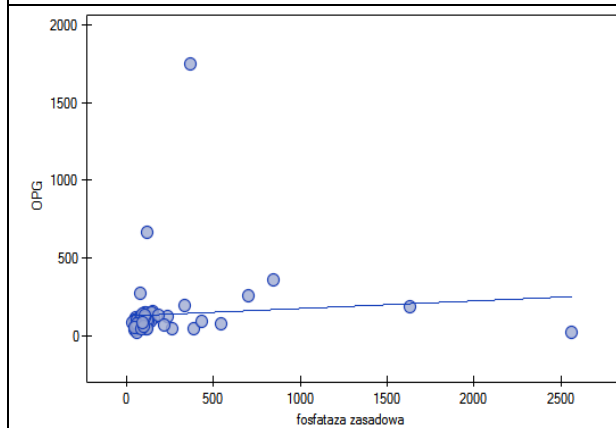
Rycina 28. Korelacja pomiędzy ekspresją OPN, a czasem od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa.



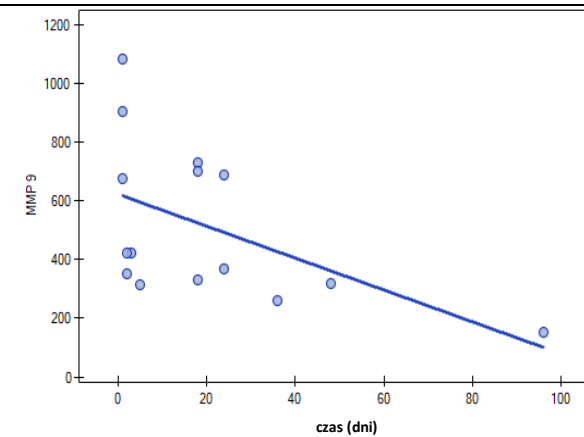
Rycina 29. Zależność pomiędzy medianami wskaźnika RANKL u chorych z przerzutami nowotworowymi do kręgosłupa a skalą De Walda.



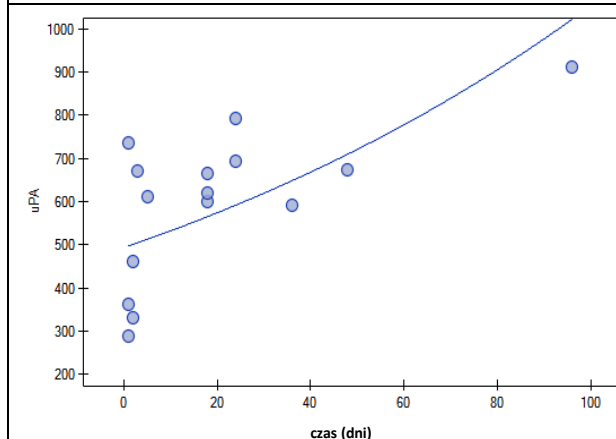
Rycina 30. Korelacja pomiędzy poziomami fosfatazy zasadowej, a ekspresją RANKL.



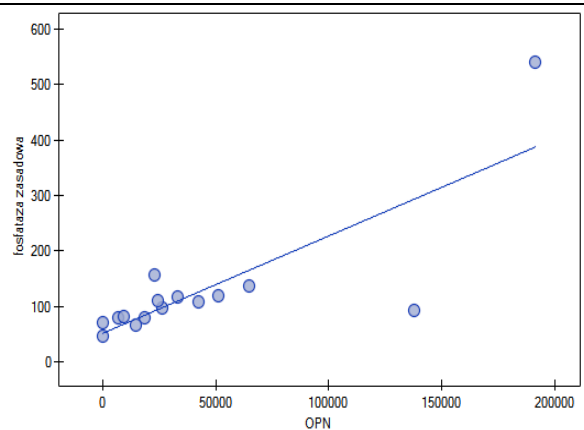
Rycina 31. Korelacja pomiędzy poziomem fosfatazy zasadowej a ekspresją RANKL.



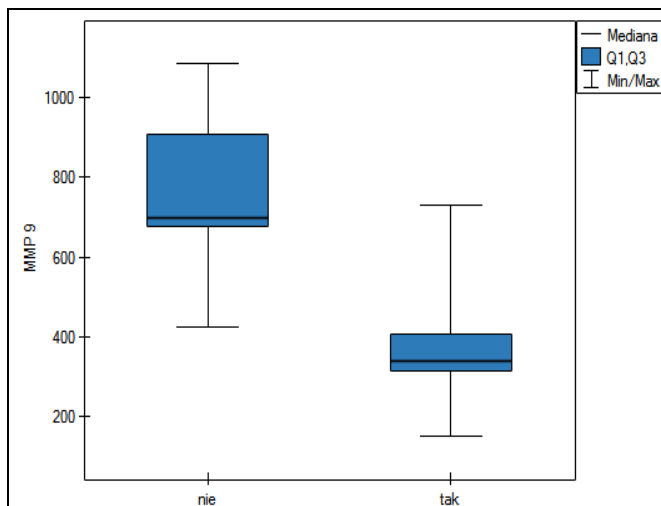
Rycina 32. Korelacja pomiędzy ekspresją MMP9, a czasem od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa.



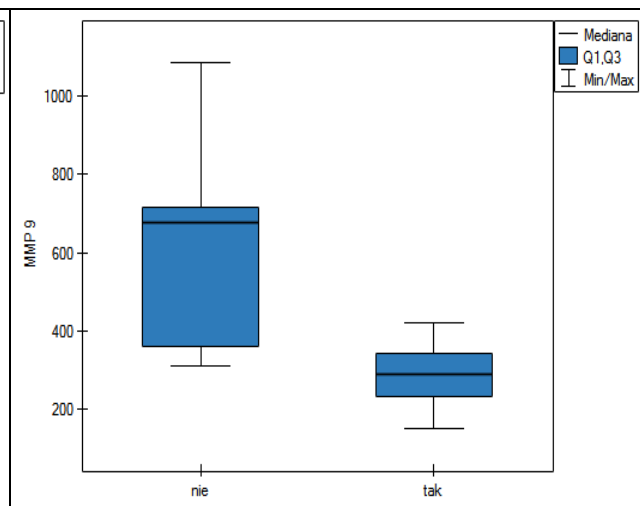
Rycina 33. Korelacja pomiędzy ekspresją uPA, a czasem od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu nowotworowego do kręgosłupa.



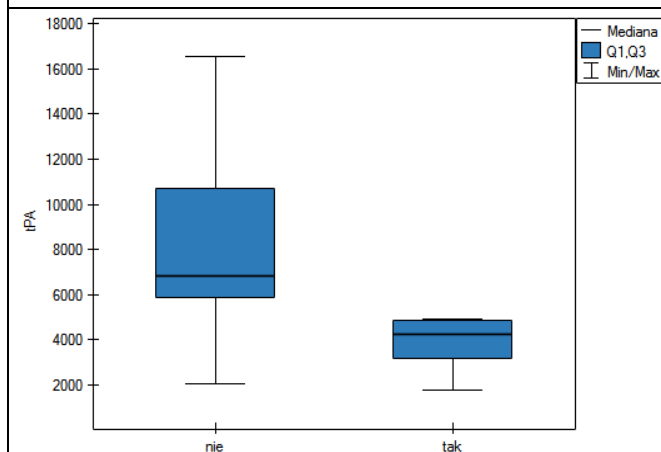
Rycina 34. Zależność pomiędzy poziomami aktywności OPN i fosfatazy zasadowej.



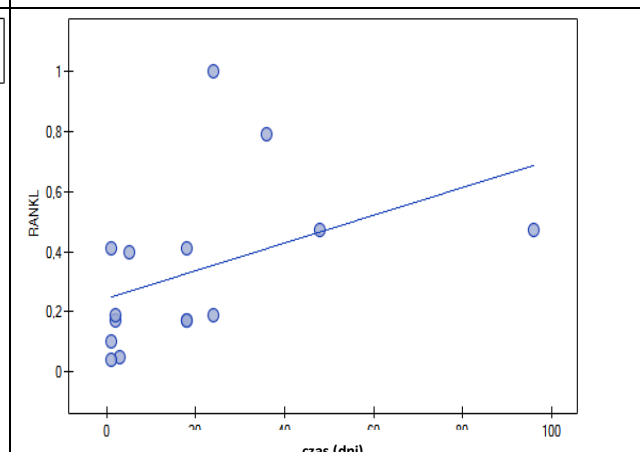
Rycina 35. Zależność pomiędzy aktywnością MMP9, a zastosowaniem radioterapii.



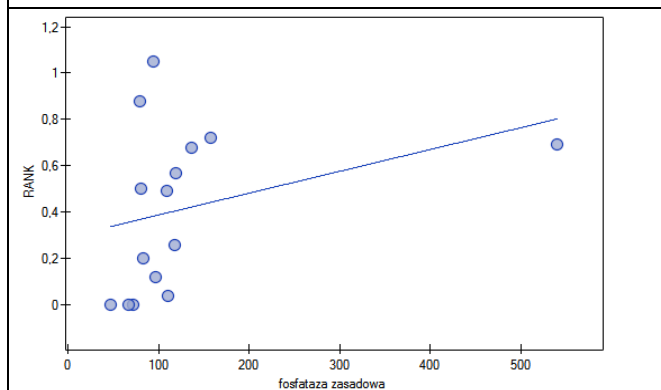
Rycina 36. Zależność pomiędzy aktywnością MMP9, a zastosowaniem bifosfonianów.



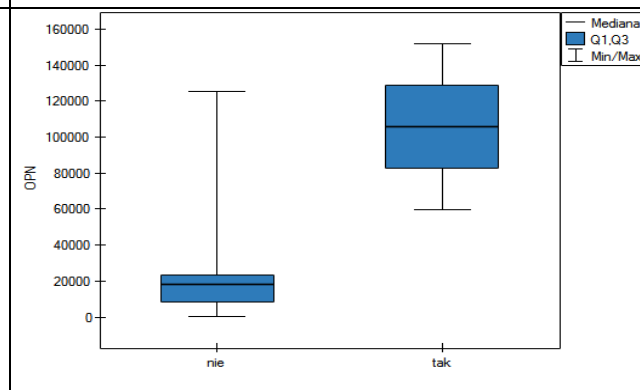
Rycina 37. Zależność pomiędzy aktywnością tPA, a zastosowaniem bifosfonianów.



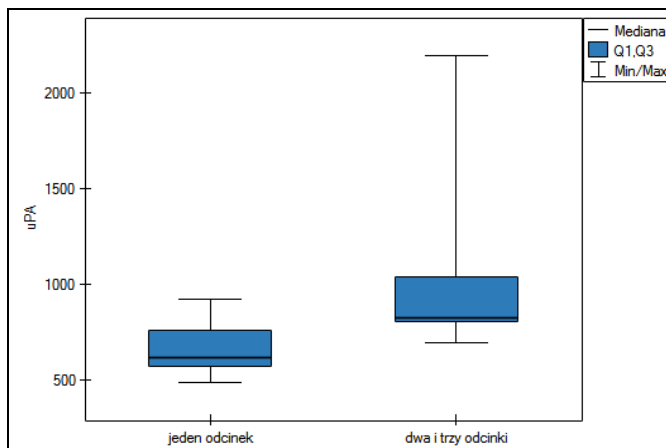
Rycina 38. Zależność pomiędzy poziomem aktywności RANKL, a czasem wystąpienia pierwszych objawów przerzutów nowotworowych do kości.



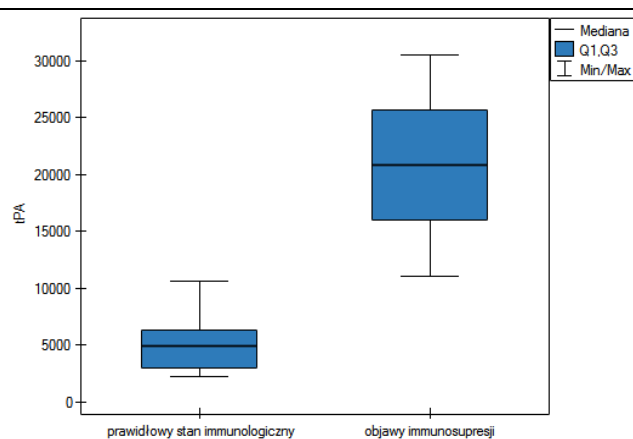
Rycina 39. Zależność pomiędzy aktywnością RANKL, a stężeniem fosfatazy zasadowej.



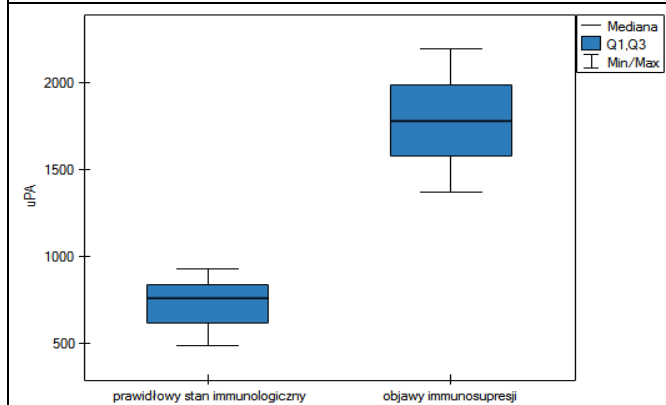
Rycina 40. Zależność pomiędzy poziomem aktywności OPN, a obecnością przerzutów do kości jako pierwszego objawu choroby nowotworowej.



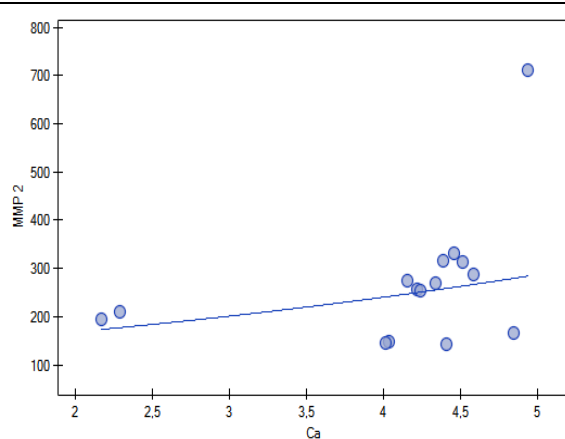
Rycina 41. Zależność pomiędzy aktywnością uPA, a rozległością zmian w kręgosłupie.



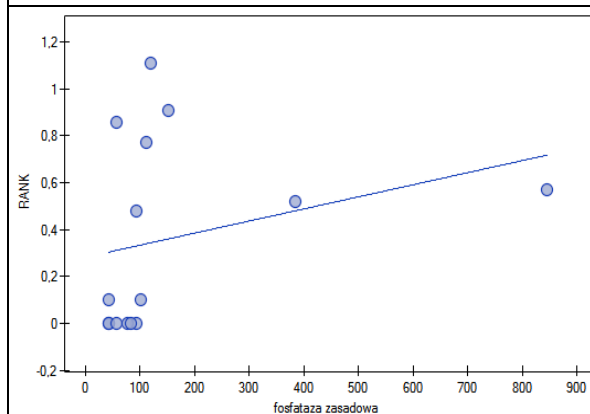
Rycina 42. Zależność pomiędzy aktywnością tPA, a skalą De Waldy.



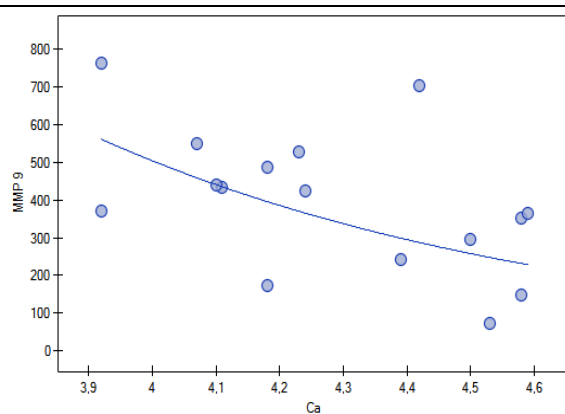
Rycina 43. Zależność pomiędzy aktywnością uPA, a skalą De Waldy.



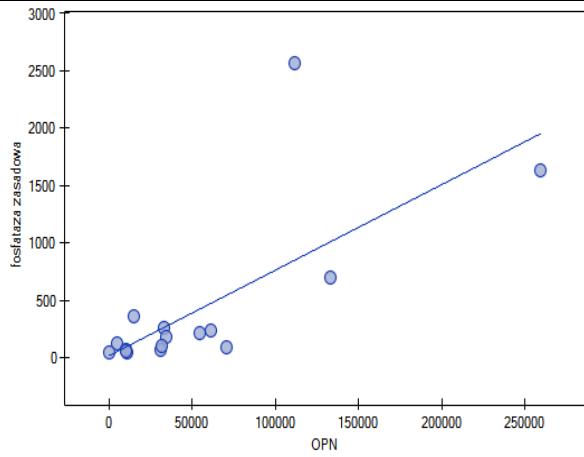
Rycina 44. Zależność pomiędzy aktywnością MMP2, a poziomem wapnia zjonizowanego.



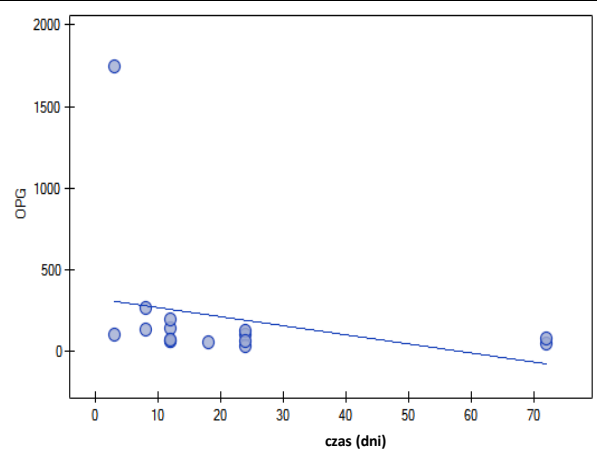
Rycina 45. Zależność pomiędzy aktywnością RANK, a poziomem fosfatazy zasadowej.



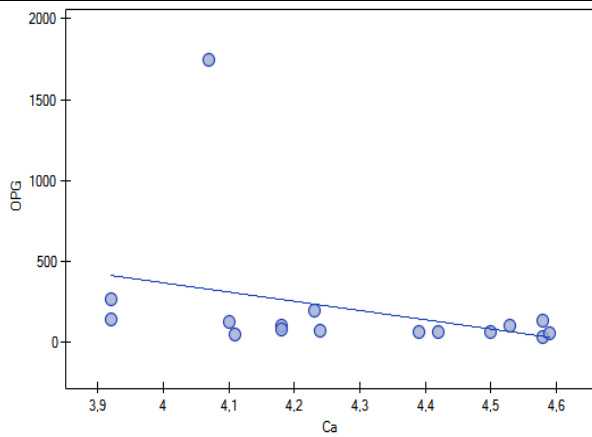
Rycina 46. Zależność pomiędzy aktywnością MMP9, a poziomem Ca.



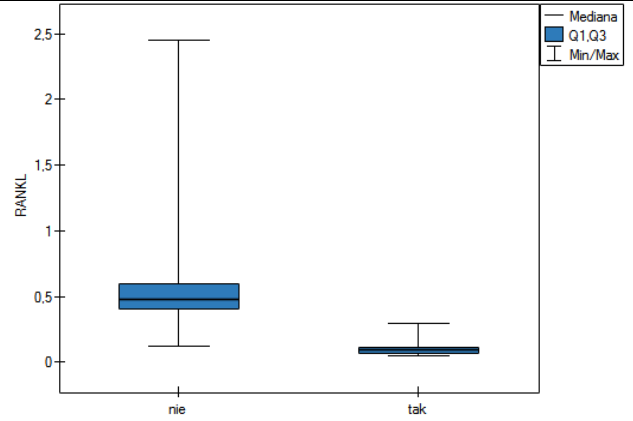
Rycina 47. Zależność pomiędzy poziomem aktywności OPN a fosfatazy zasadowej.



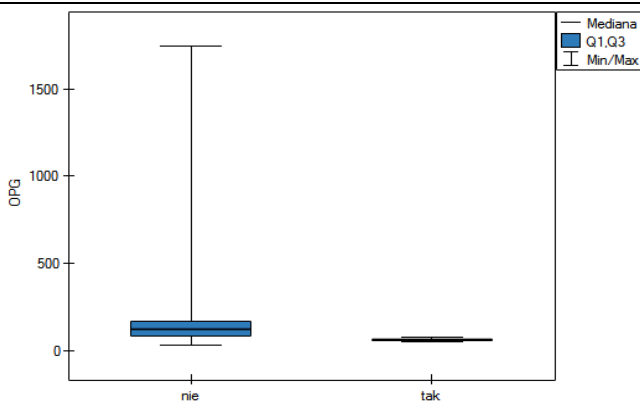
Rycina 48. Zależność pomiędzy aktywności OPG, a czasem od wystąpienia pierwszych objawów przerzutu do kręgosłupa.



Rycina 49. Zależność pomiędzy aktywności OPG, a poziomem wapnia.



Rycina 50. Zależność pomiędzy aktywności RANKL, a stosowaniem hormonoterapii.



Rycina 51. Zależność pomiędzy aktywności OPG, a stosowaniem bifosfonianów.

