

Katarzyna Sikora

**Rak wielopostaciowy płuca (*pleomorphic carcinoma*) - charakterystyka
kliniczno-patologiczna, immunofenotyp, czynniki prognostyczne
i predykcyjne**

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: prof. nadzw. dr hab. n. med. Renata Langfort

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Małgorzata Szolkowska

Zakład Patomorfologii
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc

Warszawa 2021

Składam serdeczne podziękowania:

Pani prof. dr hab. n. med. Renacie Langfort za inspirację, wskazówki merytoryczne, poświęcony czas, cierpliwość i okazaną pomoc w trakcie powstawania tej pracy.

Pani dr hab. n. med. Małgorzacie Szólkowskiej za pomoc na wielu etapach przygotowania tej pracy oraz słowa otuchy w trudnych chwilach.

Pani Krystynie Zacharskiej i Panu mgr. Pawłowi Padewskiemu za techniczne przygotowanie i opracowanie badań.

Pani dr Irenie Nadolskiej i Panu dr. Robertowi Bojarunowi z Zakładu Patomorfologii MSzS w Radomiu za wsparcie, zrozumienie i pomoc w codziennej pracy.

Spis treści

Wykaz skrótów	6
1. Wstęp	8
1.1 Epidemiologia, czynniki ryzyka raka wielopostaciowego płuca	9
1.2 Charakterystyka kliniczna	9
1.3 Diagnostyka mikroskopowa	10
1.4 Obraz makroskopowy	11
1.5 Rokowanie i czynniki rokownicze	11
1.6 Klasyfikacja histopatologiczna i stopień zaawansowania raka wielopostaciowego wg WHO i TNM	12
1.6.1 Klasyfikacja histopatologiczna WHO	12
1.6.2 Klasyfikacja TNM i stopień zaawansowania choroby (<i>stage grouping</i>)	14
1.7 Badanie mikroskopowe: budowa histologiczna, podtypy morfologiczne, diagnostyka immunohistochemiczna	14
1.7.1 Budowa histologiczna	14
1.7.2 Diagnostyka immunohistochemiczna	20
1.8 Diagnostyka różnicowa	21
1.9 Badania molekularne	22
1.10 Ekspresja PD-L1	23
1.11 Szerzenie się raka przestrzeniami powietrznymi - STAS	24
1.12 Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna	25
1.13 Leczenie	25
2. Założenia pracy	27
3. Cel pracy	29
4. Materiał i metody	30
4.1 Materiał	30
4.2 Metody	30
4.2.1 Dane kliniczne	30
4.2.2 Badanie histologiczne	31
4.2.3 Badanie immunohistochemiczne	34
4.2.4 Metody statystyczne	37
5. Wyniki	39
5.1 Dane kliniczne	39

5.2	Stopień zaawansowania	41
5.3	Typy histologiczne utkania	43
5.4	Obecność martwicy.....	45
5.5	Inwazja naczyń limfatycznych i krwionośnych.....	46
5.6	Badania immunohistochemiczne	48
5.7	Ekspresja PD-L1	53
5.8	STAS.....	59
5.9	Przeżycie całkowite (OS).....	61
5.9.1	Przeżycie całkowite a stopień zaawansowania	62
5.9.2	Przeżycie całkowite a obecność martwicy.....	63
5.9.3	Przeżycie całkowite a inwazja naczyń limfatycznych i krwionośnych	63
5.9.4	Przeżycie całkowite a typ histologiczny komponentu nabłonkowego	65
5.9.5	Przeżycie całkowite a typ histologiczny komponentu mięsakowatego	66
5.9.6	Przeżycie całkowite a ekspresja markerów immunohistochemicznych transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej.....	67
5.9.7	Przeżycie całkowite a ekspresja PD-L1	68
5.9.8	Przeżycie całkowite a STAS	69
5.9.9	Analiza wieloczynnikowa predyktorów czasu przeżycia całkowitego.....	69
5.10	Przeżycie wolne od choroby (DFS)	71
5.10.1	Przeżycie wolne od choroby a stopień zaawansowania.....	72
5.10.2	Przeżycie wolne od choroby a obecność martwicy	72
5.10.3	Przeżycie wolne od choroby a inwazja naczyń limfatycznych i krwionośnych	73
5.10.4	Przeżycie wolne od choroby a typ komponentu nabłonkowego.....	75
5.10.5	Przeżycie wolne od choroby a typ histologiczny komponentu mięsakowatego	75
5.10.6	Przeżycie wolne od choroby a ekspresja markerów immunohistochemicznych transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej	76
5.10.7	Przeżycie wolne od choroby a ekspresja PD-L1.....	77
5.10.8	Przeżycie wolne od choroby a STAS.....	78
5.10.9	Analiza wieloczynnikowa predyktorów przeżycia wolnego od choroby	80
6.	Dyskusja	82
6.1	Obraz kliniczno-patologiczny	82
6.1.1	Dane kliniczne	82

6.1.2	Obraz mikroskopowy.....	84
6.1.3	Badania immunohistochemiczne	86
6.1.4	Martwica	91
6.1.5	Inwazja naczyń krwionośnych i limfatycznych.....	92
6.2	Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna.....	93
6.3	Ekspresja PD-L1	97
6.4	Szerzenie się raka przestrzeniami powietrznymi (STAS)	101
6.5	Całkowity czas przeżycia, przeżycie wolne od choroby i czynniki prognostyczne 109	
7.	Podsumowanie.....	114
8.	Wnioski.....	116
9.	Streszczenie	119
10.	Summary.....	129
11.	Piśmiennictwo	139
12.	Załączniki	147
13.	Spis tabel	149
14.	Spis rycin	152
15.	Spis fotografii	153

Wykaz skrótów

AC	rak gruczołowy (ang. <i>adenocarcinoma</i>)
BVI	inwazja naczyń krwionośnych (ang. <i>blood vessels invasion</i>)
CS	mięsakorak (ang. <i>carcinosarcoma</i>)
DFS	czas przeżycia wolnego od nawrotu choroby (ang. <i>desease free survival</i>)
EGF	nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. <i>epithelial growth factor</i>)
EMT	transformacja nabłonkowo-mezenchymalna (ang. <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
FGF	fibroblastyczny czynnik wzrostu (ang. <i>fibroblast growth factor</i>)
G-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GC	rak olbrzymiokomórkowy (ang. <i>giant-cell carcinoma</i>)
gc	utkanie olbrzymiokomórkowe (ang. <i>giant cell</i>)
hs	wysoki STAS (ang. <i>high STAS</i>)
IASLC	Międzynarodowe Stowarzyszenie Badań nad Rakiem Płuca (ang. <i>The International Association for the Study of Lung Cancer</i>)
IHC	badanie immunohistochemiczne
KRN	Krajowy Rejestr Nowotworów
KRRP	Krajowy Rejestr Raka Płuca
LCC	rak wielkokomórkowy (ang. <i>large cell carcinoma</i>)
ls	niski STAS (ang. <i>low STAS</i>)
LVI	inwazja naczyń limfatycznych (ang. <i>lymphatic vessels invasion</i>)
ME	mieszane utkanie nabłonkowe: ACC i SCC lub rak gruczołowo-płaskonabłonkowy
ms	utkanie mięsakovate mieszane: olbrzymio- i wrzecionowatokomórkowe
MTA1	białko towarzyszące przerzutom 1 (ang. <i>metastasis-associated protein 1</i>)
NSCLC	rak niedrobnokomórkowy płuca (ang. <i>non-small cell lung carcinoma</i>)
OS	całkowite przeżycie (ang. <i>overall survival</i>)
PC	rak wielopostaciowy (ang. <i>pleomorphic carcinoma</i>)

PD-L1	ligand receptora programowanej śmierci komórek (ang. <i>programmed death-ligand 1</i>)
PET-CT	pozytonowa tomografia emisyjna z tomografią komputerową (ang. <i>Positron Emission Tomography-Computed Tomography</i>)
PSC	raki mięsakowate płuca (ang. <i>pulmonary sarcomatoid carcinoma</i>)
RTU	gotowe do użycia (ang. <i>ready to use</i>)
SC	rak wrzecionowatokomórkowy (ang. <i>spindle-cell carcinoma</i>)
sc	utkanie wrzecionowatokomórkowe (ang. <i>spindle cell</i>)
SCC	rak płaskonabłonkowy (ang. <i>squamous cell carcinoma</i>)
SEER	rejstry nowotworowe SEER (ang. <i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>)
STAS	szerzenie się nowotworu przestrzeniami powietrznymi (ang. <i>spread through air spaces</i>)
STAKS	szerzenie się wzdłuż powierzchni noża (ang. <i>spreading through a knife surface</i>)
SUV	standardowa wartość wychwyty (ang. <i>standard uptake value</i>)
TGF- β	transformujący czynnik wzrostu beta (ang. <i>transforming growth factor-β</i>)
TI	wyspy nowotworowe (ang. <i>tumor islands</i>)
TMB	liczba mutacji (ang. <i>tumor mutational burden</i>)
TNM	klasyfikacja oceny stopnia zaawansowania klinicznego
TPS	odsetek komórek raka wykazujących jakikolwiek dodatni odczyn błonowy z przeciwciałem PD-L1 w stosunku do wszystkich komórek raka (ang. <i>Tumor Proportion Score</i>)
TTF1	białko transkrypcyjne regulujące morfogenezę nabłonka płucnego i rozwój tarczycy (ang. <i>thyroid transcription factor 1</i>)
UICC	Międzynarodowa Unia Walki z Rakiem (ang. <i>The Union for International Cancer Control</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)
ZEB1	czynnik transkrypcyjny ZEB1 (ang. <i>zinc-finger E-box binding homebox 1</i>)

1. Wstęp

Rak płuca należy do najczęstszych złośliwych nowotworów zarówno w Polsce, jak i na świecie (1). W roku 2017 w Polsce zarejestrowano w Krajowym Rejestrze Nowotworów 13798 zachorowań na raka oskrzela i płuc wśród mężczyzn, co stanowiło 16,7% wszystkich nowotworów złośliwych oraz 7747 wśród kobiet, odpowiednio 9,4% (2). Rak płuca jest pierwszą przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych zarówno u mężczyzn (28,4%), jak i u kobiet (17,4%), a przeżycie pięcioletnie - badane w latach 2010-2014 - wynosiło ok. 14,4% (2).

Raki płuca stanowią około 99% wszystkich nowotworów złośliwych płuc, przy czym najnowsza klasyfikacja Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) wyróżnia kilkanaście typów i podtypów, wśród nich grupę raków mięsakowatych (3).

Raki mięsakowate płuca, nazywane też sarkomatoidnymi/sarkomatycznymi (ang. *pulmonary sarcomatoid carcinoma*, PSC), są niejednorodną grupą rzadkich, złośliwych nowotworów nabłonkowych, które charakteryzują się histologicznie obecnością utkania przypominającą złośliwe nowotwory podścieliskowe - mięsaki. Typowy komponent raka niedrobnokomórkowego płuca może towarzyszyć utkaniu mięsakowatemu w różnych proporcjach lub może być nieobecny (3). Nowotwory te, ze względu na swój dualizm morfologiczny związany z przemianą komórek nabłonkowych w komórki mezenchymalne, w wyniku złożonego procesu transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), od lat wzbudzają zainteresowanie badaczy i stanowią model dla rozważań o możliwościach różnicowania komórkowego (4), (5). Do grupy tej zaliczane są: rak wielopostaciowy, rak wrzecionowatokomórkowy i rak olbrzymiokomórkowy, które ze względu na podobieństwo morfologiczne i cechy kliniczne w ostatniej klasyfikacji WHO zostały ujęte w jedną grupę raka wielopostaciowego (ang. *pleomorphic carcinoma*, PC). Wśród raków mięsakowatych znalazły się również bardzo rzadkie postacie nowotworów o odmiennej budowie histologicznej: mięsakoraki i płucny *blastoma* (3).

Najczęstszym nowotworem w tej grupie jest rak wielopostaciowy zbudowany z utkania raka płaskonabłonkowego, gruczołowego lub wielkokomórkowego oraz komponentu wrzecionowatokomórkowego i/lub olbrzymiokomórkowego (który stanowi minimum 10% zmiany) lub wyłącznie z komórek wrzecionowatych oraz olbrzymich bez elementu nabłonkowego. Raki zbudowane wyłącznie z komórek wrzecionowatych bądź wyłącznie

z komórek olbrzymich nazywane są odpowiednio rakami wrzecionowatokomórkowymi (ang. *spindle-cell carcinoma*, SC) lub olbrzymiokomórkowymi (ang. *giant-cell carcinoma*, GC) (3). Raki wielopostaciowe charakteryzują się agresywniejszym przebiegiem i gorszym rokowaniem niż inne raki niedrobnokomórkowe płuca (ang. *non-small cell lung carcinoma*, NSCLC). Ze względu na rzadkość występowania, badania opierają się na niewielkich, kilkudziesięcioosobowych grupach chorych, co utrudnia analizę danych, wnioskowanie i wypracowanie strategii terapeutycznej dla tej grupy chorych.

1.1 Epidemiologia, czynniki ryzyka raka wielopostaciowego płuca

Rak wielopostaciowy stanowi ok. 0,1-0,75% raków niedrobnokomórkowych płuca (6), (7), (8) oraz ok. 1,5-3% przypadków operowanych NSCLC (9), (10), (11), (12). Występuje u chorych w różnym wieku (32-89 lat), ale najczęściej pojawia się w szóstej dekadzie życia. Częściej dotyczy mężczyzn niż kobiet, przeważnie osób rasy białej. Większość (ok. 70-96%) pacjentów to osoby palące papierosy lub z wywiadem palenia, na ogół tzw. intensywni palacze (ang. *heavy smokers*) (6), (9), (12), (13), (14), (15), (16), (17).

1.2 Charakterystyka kliniczna

Objawy kliniczne raka wielopostaciowego są podobne jak w innych NSCLC. Dominują: kaszel (30-60%), ból w klatce piersiowej (15-30%), krwiotłucie (40-50%), utrata masy ciała (25-30%), męczliwość (45%), duszność (3-30%), rzadko gorączka (3%), która na ogół pojawia się w przypadkach guzów zlokalizowanych wewnątrzskrzelowo, co jest związane z zamknięciem oskrzela, niedodmą i wtórnym zapaleniem płuca, (6), (7), (9), (11) (13), (14), (18). W przypadkach raka olbrzymiokomórkowego opisywano neutrofilie obwodową i gorączkę spowodowaną produkcją czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) oraz inne zespoły paranowotworowe (19). Około 15-20% pacjentów nie wykazuje objawów choroby, a zmiana jest wykrywana przypadkowo (9), (10), (13), (14).

Rak wielopostaciowy występuje z podobną częstością w obu płucach. W ok. 70% przypadków zlokalizowany jest w części obwodowej, rzadziej w części centralnej płuca i wewnątrzskrzelowo, najczęściej w płatach górnych (ok. 65%), następnie dolnych (ok. 15-25%) i płacie środkowym (ok. 5%) (6), (7), (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15), (20).

W tomografii komputerowej klatki piersiowej raki wielopostaciowe nie prezentują specyficznych cech pozwalających na ich odróżnienie od innych NSCLC. W większości przypadków towarzyszy im centralne przejaśnienie lub jama, co jest związane z martwicą oraz cechy naciekania opłucnej lub ściany klatki piersiowej (14), (21), (22). W zintegrowanym badaniu pozytonowej tomografii emisyjnej z tomografią komputerową klatki piersiowej (ang. *Positron Emission Tomography-Computed Tomography*, PET-CT) raki wielopostaciowe charakteryzują się znacznie zwiększonym wychwytem F-18-fluorodeoksyglukozy (FDG) i wysoką standardową wartością wychwyty (ang. *standard uptake value*, SUV) rzędu 14.3 ± 3.1 (10), (16).

Według Międzynarodowej Unii Walki z Rakiem (ang. *The Union for International Cancer Control*, UICC) w momencie ustalenia rozpoznania ok. 40 % chorych wykazuje znaczny stopień zaawansowania choroby. Jedynie niewielka część - ok. 14-20% - znajduje się w I stopniu, natomiast ok. 12-19% w II i ok. 26-47% w III stopniu zaawansowania choroby (6), (7), (8), (14), (20). Przerzuty nowotworowe zajmują okoliczne węzły chłonne, pojawiają się również w płucach, kościach, nadnerczach, wątrobie i mózgu. W porównaniu z innymi postaciami morfologicznymi NSCLC, przerzuty nowotworowe częściej stwierdza się w rzadkich lokalizacjach: w przewodzie pokarmowym, przestrzeni zaotrzewnowej, w nerkach i trzustce (6), (11), (16), (23).

1.3 Diagnostyka mikroskopowa

Ze względu na heterogenność obrazu mikroskopowego, postawienie rozpoznania raka wielopostaciowego przed operacją jest trudne. W materiałach oligobiopsyjnych, pobranych w trakcie bronchoskopii, biopsji cienkoigłowych i gruboigłowych przez ścianę klatki piersiowej czy na podstawie wycinków z torakoskopii, PC najczęściej jest rozpoznawany jako nisko zróżnicowany rak niedrobnokomórkowy, rak płaskonabłonkowy lub gruczolowy, które stanowią komponent raka wielopostaciowego. Zgodność rozpoznań przed- i pooperacyjnych jest niska i waha się od 10% (10), (16), (24) do 30-40% (14), (25), (26). Pomimo to, uważa się, że rozpoznanie PC w oparciu o materiał cytologiczny i małe wycinki jest możliwe, zwłaszcza w przypadku stwierdzenia w badaniu mikroskopowym obu komponentów. Jednak ostateczne rozpoznanie wymaga przebadania dużego materiału, najczęściej operacyjnego i oceny wielu wycinków (3), (11), (19), (23).

1.4 Obraz makroskopowy

Raki wielopostaciowe są zmianami średnicy od 0,6 do 19cm, najczęściej ok. 5cm (7), (8), (9), (12), (13), (20), (23), (24), co oznacza, że średnia wielkość operowanych raków wielopostaciowych zwykle jest większa niż innych NSCLC, która wynosi ok. 3,5cm (7), (8).

Makroskopowo PC są guzami szaro-białymi, na ogół źle odgraniczonymi, z centralną martwicą i/lub wylewami krwi w podścielisku (4), (12), (13), (16). Często lokalizują się obwodowo, wciągając opłucną płucną. W ok. ¼ przypadków naciekają również ścianę klatki piersiowej (27). Niekiedy mogą powodować jednolite pogrubienie opłucnej płucnej, imitując naciek międzybłoniaka (27).

1.5 Rokowanie i czynniki rokownicze

Większość badań wskazuje, że raki wielopostaciowe mają agresywny przebieg kliniczny i złe rokowanie. Średni czas przeżycia chorych operowanych wynosił ok. 10-19 miesięcy, a pięcioletni współczynnik przeżycia wahał się od ok. 15% do 29% w zależności od badanej grupy chorych, jej wielkości oraz stopnia zaawansowania choroby (6), (7), (9), (12), (14), (15), (16), (17), (18).

Rokowanie w rakach wielopostaciowych płuca jest gorsze niż w innych postaciach NSCLC (7), (9), (19), (23). Porównanie raków wielopostaciowych leczonych operacyjnie z innymi NSCLC w tym samym stopniu zaawansowania (6), (15), wykazuje, że średnie przeżycie i przeżycie 5-letnie u chorych operowanych wynosiły odpowiednio: 17,4 miesiąca i 24,5% dla PC, a dla innych postaci NSCLC: 80,3 miesiąca i 46,3% (6), (15). Raki wielopostaciowe miały także krótszy czas przeżycia wolnego od nawrotu choroby (ang. *desease free survival*, DFS) w stosunku do pozostałych NSCLC: 11,3 vs 61,4 miesiąca (15). W innym doniesieniu całkowite przeżycie w PC było niższe: 9,9 miesiąca w porównaniu do raka gruczołowego i płaskonabłonkowego, odpowiednio 25,2 i 16,8 miesiąca (6). W niektórych pracach, pomimo agresywniejszego przebiegu klinicznego PC, nie wykazano jednak różnic w całkowitym przeżyciu w porównaniu z innymi postaciami NSCLC (7), (28). Badania porównawcze wykazały także, że w momencie rozpoznania PC charakteryzują się większą średnicą, wyższym stopniem zaawansowania, częstszym naciekaniem opłucnej i występowaniem zatorów z komórek raka w naczyniach krwionośnych.

Dane dotyczące czynników prognostycznych są rozbieżne, co związane jest nie tylko z niedużą liczebnością grup i badanym kryterium, ale także z metodologią i zmieniającą się klasyfikacją.

Autorzy dostępnych publikacji zwracają uwagę, że w rakach wielopostaciowych bardzo często występują cechy morfologiczne wiążące się z agresywniejszym przebiegiem choroby, takie jak: zatory z komórek raka w naczyniach limfatycznych i krwionośnych, rozległa martwica, co może być związane z częstszymi nawrotami miejscowymi i rozprzestrzenianiem się choroby, z pojawianiem się odległych przerzutów (9), (12), (17), (24).

Nie stwierdzono istotnego wpływu typu histologicznego komponentu nabłonkowego i mięsakowego na całkowity czas przeżycia i na czas przeżycia wolny od choroby (12), (18), jednak obserwowano krótsze, pięcioletnie przeżycie, przy obecności komponentu raka wielkokomórkowego (9), (16), (24). W pojedynczym badaniu komponent nabłonkowy inny niż płaskonabłonkowy korelował z dłuższym przeżyciem całkowitym (17).

1.6 Klasyfikacja histopatologiczna i stopień zaawansowania raka wielopostaciowego wg WHO i TNM

1.6.1 Klasyfikacja histopatologiczna WHO

Klasyfikacja i nazewnictwo nowotworów płuca o pleomorficznym, złożonym różnicowaniu na przestrzeni lat ulegały zmianom. W pierwszej klasyfikacji WHO z 1968r. występował jedynie rak olbrzymiokomórkowy, jako podtyp raka wielkokomórkowego, a inne postacie morfologiczne należały do kategorii guzów „mieszanych”. W klasyfikacji WHO z 1981r. raki z komponentem olbrzymiokomórkowym pozostały w grupie raków wielkokomórkowych, natomiast z komponentem wrzecionowatokomórkowym zostały włączone do raków płaskonabłonkowych (29). Z czasem pojawiały się także nowe określenia takie jak: raki mięsakowate, mięsakopodobne (sarkomatoidne), mięsakowe (sarkomatyczne), raki z elementami mięsakopodobnymi/mięsakowymi. Po raz pierwszy określenia „rak pleomorficzny” (ang. *pleomorphic carcinoma*) użyła Fishback w roku 1994, opisując grupę raków płuca z różnicowaniem wrzecionowato- i olbrzymiokomórkowym (18). Klasyfikacja WHO z 1999r., przygotowana przy współpracy z Międzynarodowym Stowarzyszeniem Badań nad Rakiem Płuca (ang. *The International Association for the Study of Lung Cancer*, IASLC), wyodrębniła oddzielną grupę raków z elementami pleomorficznymi, mięsakopodobnymi

i mięsakowymi (ang. *carcinoma with pleomorphic, sarcomatoid or sarcomatous elements*) (30). Do grupy tej włączono „nisko zróżnicowane raki niedrobnokomórkowe, które zawierają komponent mięsaka lub elementy mięsakopodobne”. W kolejnej nowelizacji z 2004r. raki te nazwano mięsakowatymi (ang. *sarcomatoid carcinoma*), natomiast definicja nowotworów należących do tej grupy nie uległa zmianie (31). W roku 2015 pozostawiono określenie raki mięsakowate/sarkomatoidne jako ogólną nazwę grupy, ale wszystkie nowotwory do niej należące sklasyfikowano jako oddzielne pozycje (11). W ostatniej wersji, opublikowanej w roku 2021, połączono raka wielopostaciowego, wrzecionowatokomórkowego i olbrzymiokomórkowego w jedną grupę raka wielopostaciowego. Porównanie zmian w klasyfikacji WHO w okresie objętym badaniem przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Zmiany w klasyfikacji WHO w okresie objętym badaniem

Klasyfikacja WHO raków mięsakowatych płuca			
Rok 1999	Rok 2004	Rok 2015	Rok 2021
• guzy nabłonkowe, złośliwe	• guzy nabłonkowe, złośliwe	• guzy nabłonkowe, złośliwe	• guzy nabłonkowe
• raki z pleomorficznymi, mięsakowatymi lub mięsakowymi elementami (ang. <i>carcinoma with pleomorphic, sarcomatoid or sarcomatous elements</i>)	• raki mięsakowate (ang. <i>sarcomatoid carcinoma</i>)	• rak wielopostaciowy • rak wrzecionowatokomórkowy • rak olbrzymiokomórkowy • mięsakorak • płucny <i>blastoma</i>	• raki mięsakowate (ang. <i>sarcomatoid carcinoma</i>)
• raki z wrzecionowatymi i olbrzymiokomórkami: ○ rak wielopostaciowy ○ rak wrzecionowatokomórkowy ○ rak olbrzymiokomórkowy • mięsakorak • płucny <i>blastoma</i>	• rak wielopostaciowy • rak wrzecionowatokomórkowy • rak olbrzymiokomórkowy • mięsakorak • płucny <i>blastoma</i>		• rak wielopostaciowy; podtypy: ○ rak wielopostaciowy ○ rak wrzecionowatokomórkowy ○ rak olbrzymiokomórkowy • mięsakorak • płucny <i>blastoma</i>

1.6.2 Klasyfikacja TNM i stopień zaawansowania choroby (*stage grouping*)

W roku 1958 UICC po raz pierwszy opublikowała jednolity system oceny zaawansowania anatomicznego nowotworów złośliwych, który jest nieustannie aktualizowany i rozwijany. System ten składa się z dwóch części: klasyfikacji TNM, której nazwa pochodzi od pierwszych liter słów angielskich: *tumor* - guz (pierwotny), *node* - węzeł (chłonny), *metastasis* - przerzut (odległy) oraz wyznaczanego na jej podstawie, w skali rangowej, ogólnego stopnia zaawansowania choroby nowotworowej (32). System TNM pozwala na precyzyjne określenie stopnia zaawansowania choroby nowotworowej, jest podstawą do wyboru optymalnego leczenia chorego oraz umożliwia porównanie wyników badań naukowych.

Od roku 2000 zmieniały się zasady określania stopnia zaawansowania raka płuca tj. klasyfikacja TNM i stopień zaawansowania, jednak pomiędzy klasyfikacją opublikowaną przez UICC w 1997r. i 2004r. nie było różnic. Istotne zmiany zostały wprowadzone w 7 edycji, w roku 2009, i dotyczyły cech T1 i T2. Zmieniono wielkość guza kwalifikującą do danej grupy i wyodrębniono dodatkowe podgrupy: a i b. Wprowadzono także dodatkowy podział cechy M1 na dwie podgrupy a i b, co wpłynęło na zmianę stopni zaawansowania choroby. W kolejnej nowelizacji (8 edycja), obowiązującej od 2017r., ponownie zmodyfikowano kryterium wielkości guza dla wszystkich kategorii T i wprowadzono dodatkową podgrupę c do cechy M1.

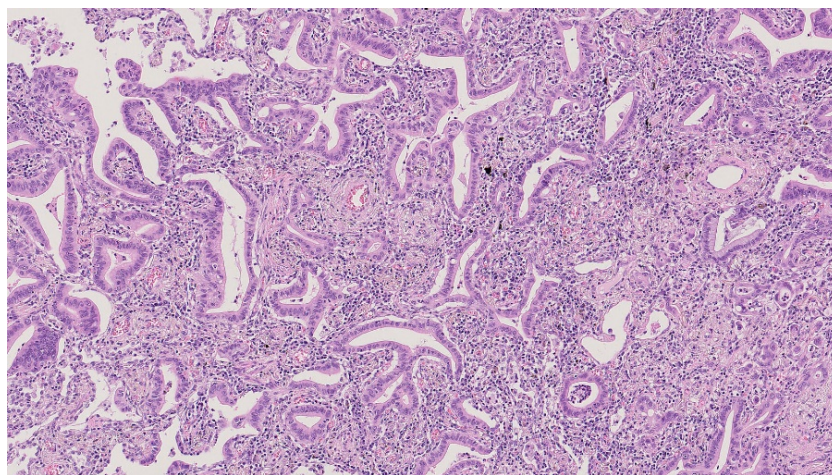
Obowiązującą klasyfikację TNM i stopień zaawansowania klinicznego choroby przedstawiono w załączniku 1 (32).

1.7 Badanie mikroskopowe: budowa histologiczna, podtypy morfologiczne, diagnostyka immunohistochemiczna

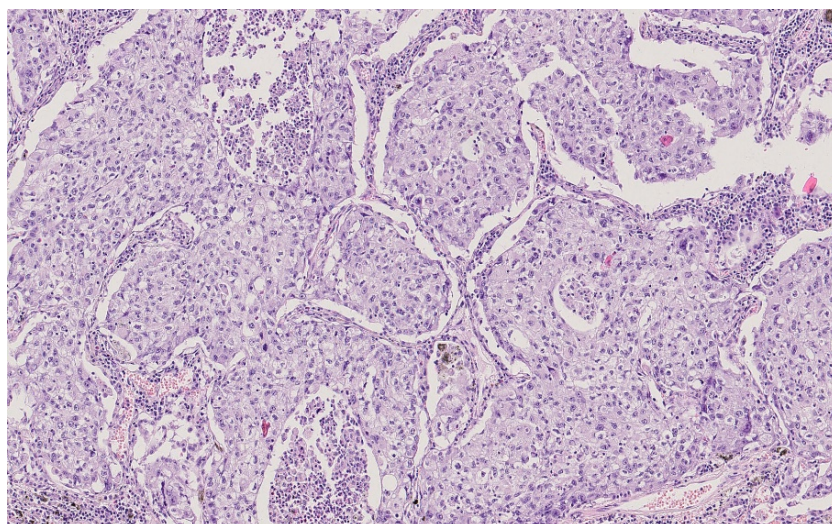
1.7.1 Budowa histologiczna

Obraz mikroskopowy raka wielopostaciowego jest bardzo różnorodny, gdyż składa się na niego komponent nabłonkowy i mięsakowaty. Komponent nabłonkowy ma postać klasycznego raka niedrobnokomórkowego, najczęściej raka gruczołowego (w ok. 40%), wielkokomórkowego (w ok. 20-60%), rzadziej płaskonabłonkowego (w ok. 10-20%) lub gruczołowo-płaskonabłonkowego (w ok. 10%) (fot. 1, fot. 2, fot. 3, fot. 4, fot. 5, fot. 6) (12), (17), (18), (28), (33), (34), (35). Możliwe jest też współistnienie kilku komponentów

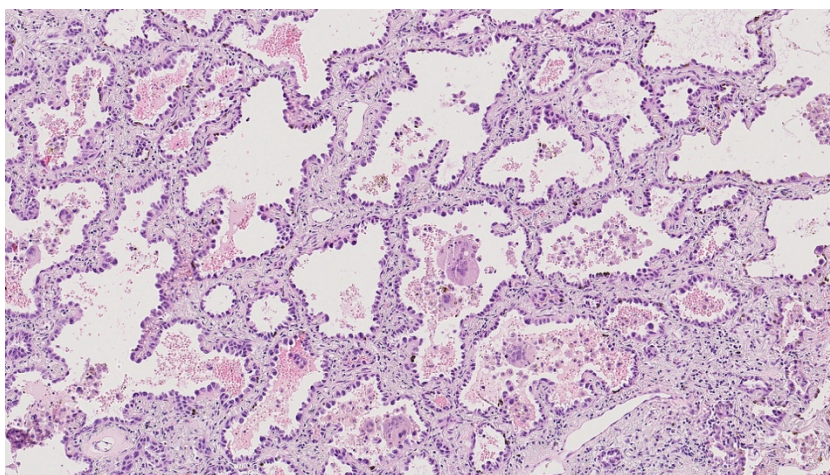
nabłonkowych. Komponent nabłonkowy może mieć postać raka o różnym stopniu zróżnicowania, chociaż często jest nisko zróżnicowany, co utrudnia jego ocenę mikroskopową, właściwe określenie postaci morfologicznej i wymaga wykonania badań immunohistochemicznych.



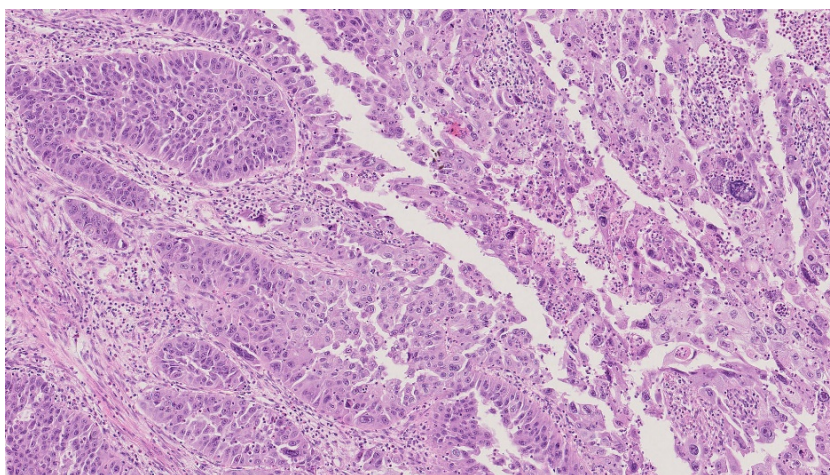
Fot. 1 Utkanie raka gruczołowego, typ zrazikowy. Barwienie HE, pow. x100



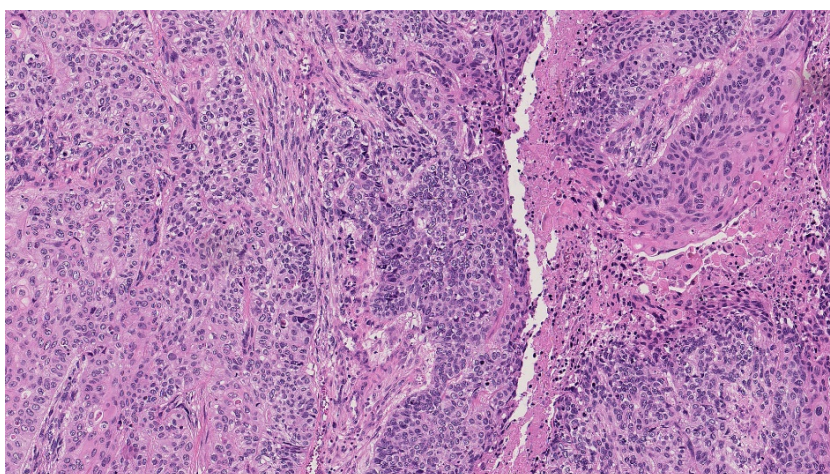
Fot. 2 Utkanie raka gruczołowego, typ lity. Barwienie HE, pow. x100



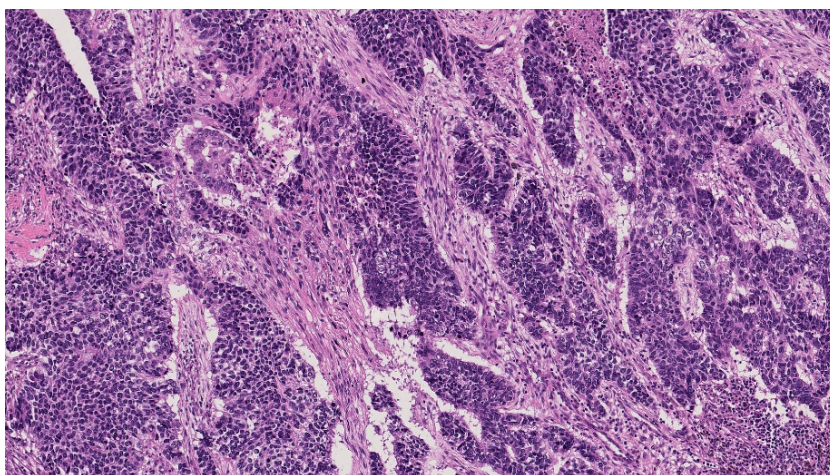
Fot. 3 Utkanie raka gruczołowego, typ tapetujący. Barwienie HE, pow. x100



Fot. 4 Utkanie raka płaskonabłonkowego, z widocznymi komórkami pleomorficznymi. Barwienie HE, pow. x100



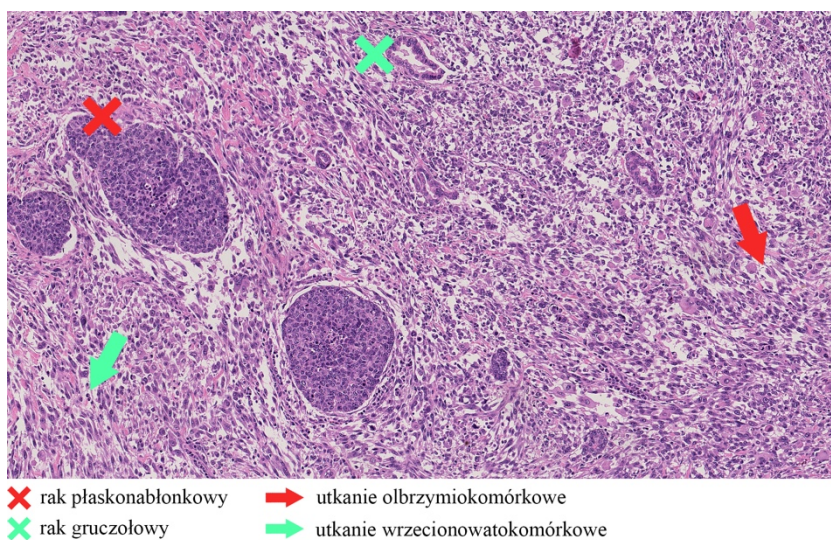
Fot. 5 Utkanie raka płaskonabłonkowego. Barwienie HE, pow. x100



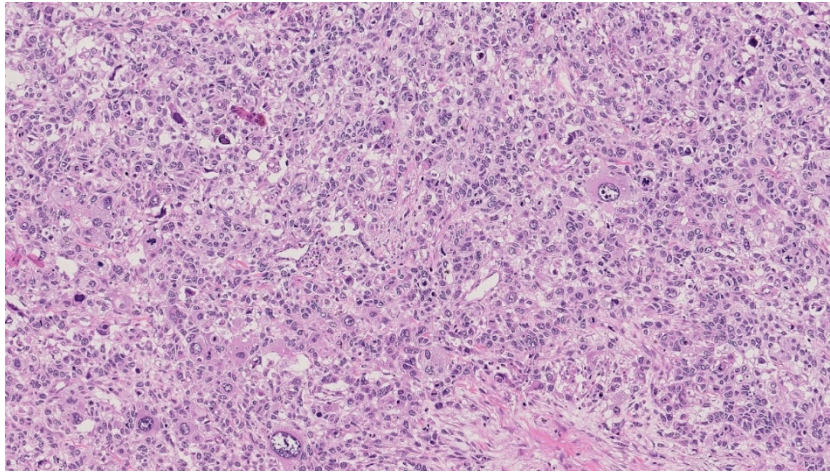
Fot. 6 Utkanie raka wielkokomórkowego. Barwienie HE, pow. x100

Komponent mięsakowaty może być wrzecionowatokomórkowy (w ok. 16-38%), olbrzymiokomórkowy (w ok. 16-35%) lub mieszany (w ok. 20-61%) (12), (18), (28), (33). Rak wielopostaciowy może składać się wyłącznie z komórek wrzecionowatych i olbrzymich, bez obecności zróżnicowanych elementów nabłonkowych (w ok. 3, 13, 23%) (28), (33), (36). Tak duża rozpiętość wyników związana jest z trudnością oceny morfologicznej tego komponentu.

Poszczególne typy utkania nabłonkowego i mięsakowatego mogą być wymieszane ze sobą lub wyraźnie odgraniczone, przypominając guzy kolizyjne (fot. 7). W rozpoznaniu każdy podtyp utkania raka powinien być wyszczególniony, pomimo że odróżnienie raka wielkokomórkowego od komponentu olbrzymiokomórkowego może być bardzo trudne lub nawet niemożliwe (fot. 8), (19), (23), (37).

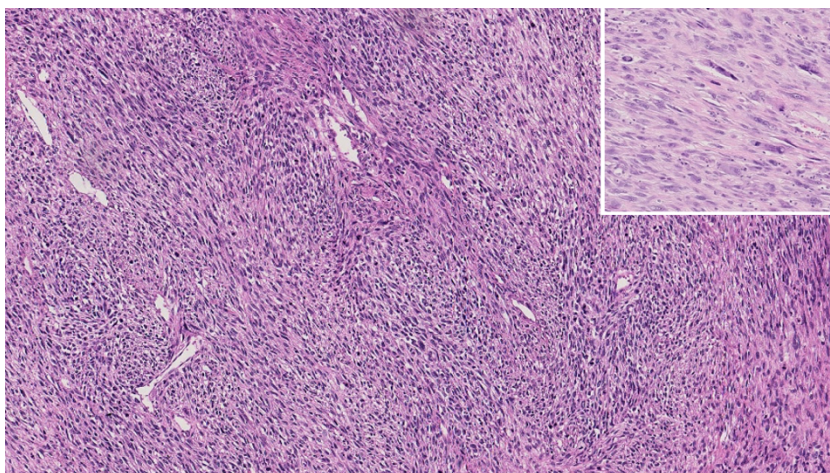


Fot. 7 Różnorodne utkania histologiczne raka. Barwienie HE, pow. x100



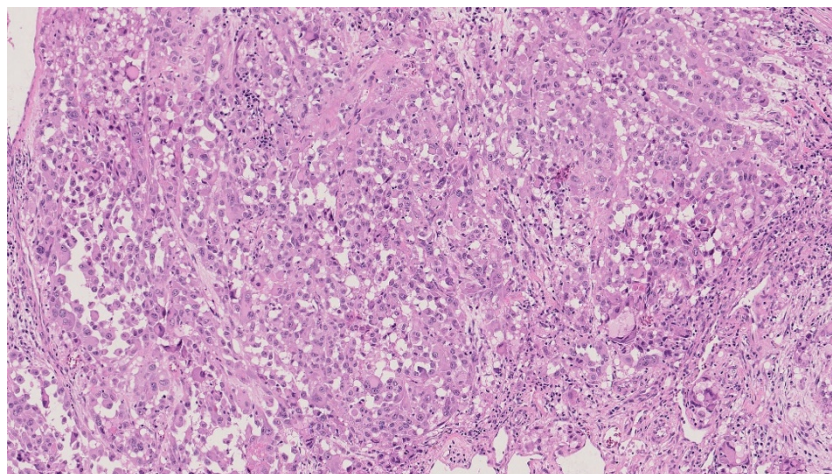
*Fot. 8 Utkanie niezróżnicowane, utkanie olbrzymiokomórkowe i rak wielkokomórkowy.
Barwienie HE, pow. x100*

Utkanie wrzecionowatokomórkowe składa się z atypowych, wydłużonych komórek o kwasochłonnej cytoplazmie, układających się w gniazda, pasma lub przeplatające się pęczki (fot. 9). Większe komórki o wyglądzie nabłonkowatych mają duże jądra z wyraźnymi jąderkami. Mniejsze, wrzecionowate - zazwyczaj nie mają jąder. Atypia komórkowa może być różnie nasilona - od małego do dużego stopnia, z obecnością pleomorficznych jąder komórkowych, co czasami przypomina utkanie złośliwych guzów włóknisto-histiocytarnych. Utkaniu wrzecionowatokomórkowemu często towarzyszy mniej lub bardziej nasilony naciek z komórek limfatycznych, czasami z domieszką granulocytów kwasochłonnych. Może występować nasilone włóknienie podścieliska, co utrudnia odróżnienie tego komponentu od zmian desmoplastycznych. Natomiast zmiany myksoidne i szkliwienie w podścielisku mogą przypominać utkanie chrzęstne (18), (19), (23), (33), (37).

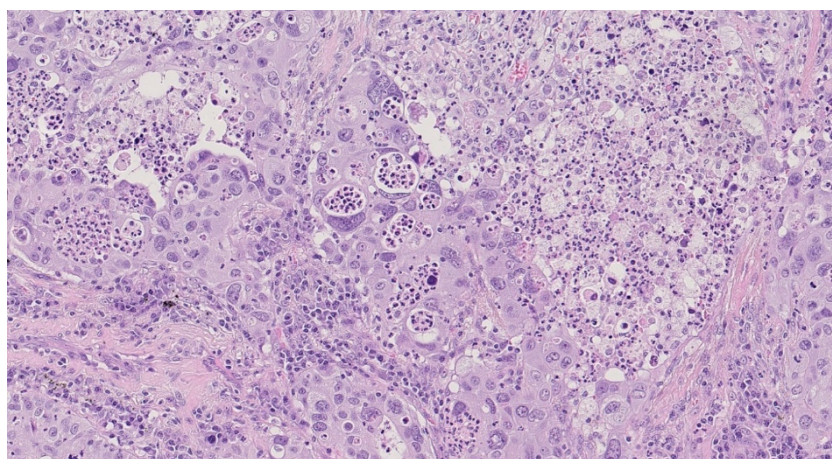


Fot. 9 Utkanie wrzecionowatokomórkowe. Barwienie HE, pow. x100 i x200

Utkanie olbrzymiokomórkowe składa się z dużych komórek o pojedynczym jądrze komórkowym lub wielojądrowych, pleomorficznych, z obfitą, zasadochłonną albo kwasochłonną cytoplazmą, niekiedy z obecnością szklistych ziarnistości (ang. *hyalin globules*) lub sfagocytowanych leukocytów (ang. *emperipolesis*) (fot. 10, fot. 11). Czasami jądra komórkowe przybierają dziwaczne kształty, przypominając utkanie syncytiotrofoblastu, lub tworzą układy o wyglądzie osteoklastów. Jąderka są często wyraźnie widoczne i bardzo duże. Komórki nowotworowe zazwyczaj wykazują nasiloną dyskohezję. Może towarzyszyć im obfity naciek z limfocytów, plazmocytów, granulocytów obojętnochłonnych, histiocytów, niekiedy również granulocytów kwasochłonnych, rzadko z domieszką komórek typu ksantomatycznego lub wielojądrzastych typu Langhansa (18), (19), (23), (33), (37).



Fot. 10 Utkanie olbrzymiokomórkowe. Barwienie HE, pow. x100



Fot. 11 Utkanie olbrzymiokomórkowe. Emperipolesis. Barwienie HE, pow. x200

W ok. 80-90% raków stwierdza się pola martwicy o różnym nasileniu, w większości obejmujące ponad 25% guza. W ok. 50-90% obecne są zatory z komórek nowotworowych

w naczyniach krwionośnych (18), (19), (23), (33), (37). Naciekanie opłucnej trzewnej i ściennej obserwuje się odpowiednio w 74% i 25% (38).

Raki wrzecionowatokomórkowy i olbrzymiokomórkowy zbudowane są z jednego typu komórek: wrzecionowatych lub olbrzymich, bez widocznego komponentu nabłonkowego. Często towarzyszy im intensywny naciek zapalny (19), (23), (27), (37).

Częstość występowania podtypów raka wielopostaciowego w badaniach obejmujących całą grupę raków mięsakowatych jest bardzo różna i waha się: dla raka wielopostaciowego 24-86% (10), (34), dla raka wrzecionowatokomórkowego 6-22% (18), (36) i dla raka olbrzymiokomórkowego 4-9% (14), (36), co pokazuje jak trudne jest odróżnienie tych postaci histologicznych. Różnice mogą być też związane ze zmieniającą się klasyfikacją, pobieraniem różnej liczby wycinków do badania oraz stosowaniem dodatkowych badań immunohistochemicznych. Raki wrzecionowato- i olbrzymiokomórkowe są bardzo rzadkie, jeśli guz jest starannie przebadany przez pobranie odpowiedniej liczby wycinków (37).

1.7.2 Diagnostyka immunohistochemiczna

Rozpoznanie mikroskopowe raka wielopostaciowego opiera się na charakterystycznym obrazie morfologicznym widocznym w standardowym barwieniu hematoksyliną-eozyną i nie wymaga wykonania badań immunohistochemicznych (IHC). Jednak w wielu przypadkach reakcje IHC ułatwiają identyfikację komponentu nabłonkowego, a także umożliwiają diagnostykę różnicową (19), (23), (37).

Dodatni odczyn immunohistochemiczny na różne cytokeratyny, najczęściej na AE1/AE3, Oscar, CAM 5.2, CK7, obserwowany jest w zarówno w komponentcie nabłonkowym (60-100%), jak i w mięsakowatym (89%). W większości przypadków nasilenie reakcji jest podobne, a jedynie w części guzów reakcja ta jest słabiej wyrażona w utkaniu mięsakowatym (12), (19), (23), (33), (34), (35). Odczyny charakterystyczne dla raków gruczołowych tj. TTF-1 i Napsin A są dodatnie w utkaniu nabłonkowym, odpowiednio w 76%, 59%, jak i mezenchymalnym - 63% i 43%, przy czym TTF-1 jest bardziej czułym markerem w porównaniu z Napsin A (12), (25), (34), (35), (36). Dodatni odczyn z przeciwciałem p40, p63 lub CK5/6 obserwowano przede wszystkim w utkaniu nabłonkowym o różnicowaniu płaskonabłonkowym i rzadko (do 8% przypadków) w części mięsakowatej (25), (34), (36).

Badano także inne markery różnicowania nabłonkowego takie jak: EMA, surfaktant białko A(SP-A) (12), Desmocollina 3 i SOX2 (34), ale nie miały one istotnego znaczenia dla rozpoznania. W utkaniu mezenchymalnym stwierdzano ogniskową, dodatnią reakcję z przeciwciałami S100, SMA i desminą w ok. 10-20% przypadków (23), (25), (35), a także ekspresję markerów międzybłoniaka: kalretyniny, WT-1, D2-40 i CK5/6 odpowiednio w: 33%, 17%, 14% i 25%, co ma istotne znaczenie w diagnostyce różnicowej (19), (35).

1.8 Diagnostyka różnicowa

Rak wielopostaciowy ze względu na szerokie spektrum obrazów morfologicznych wymaga różnicowania zarówno z wieloma nowotworami, jak i chorobami nienowotworowymi (37).

Wśród nowotworów należy uwzględnić przede wszystkim inne postacie NSCLC. Znalezienie komponentu wrzecionowato- lub olbrzymiokomórkowego w utkaniu NSCLC nie przesądza o rozpoznaniu PC. Zgodnie z arbitralnie przyjętym kryterium diagnostycznym, pola mięsakowate muszą stanowić minimum 10% guza (3), (18). Odróżnienie komponentu wrzecionowatokomórkowego od desmoplastycznej reakcji podścieliska na naciek raka może być bardzo trudne. Wówczas dodatni odczyn komórek wrzecionowatych na markery nabłonkowe AE1/AE3, CK7 zwykle jest rozstrzygający (18), (19), (33), (37).

Kolejną grupę nowotworów w diagnostyce różnicowej PC stanowią inne raki mięsakowate (19), (23), (27), (37). Mięsakorak (ang. *carcinosarcoma*, CS) różni się od raków wielopostaciowych obecnością różnicowania heterologicznego, takiego jak utkanie: mięsaka prążkowanokomórkowego (ang. *rhabdomyosarcoma*), chrząstniakomięsaka (ang. *chondrosarcoma*), kostniakomięsaka (ang. *osteosarcoma*). Elementy te mogą być widoczne jedynie ogniskowo. W przypadkach wątpliwych badanie immunohistochemiczne bywa niezwykle pomocne, ale należy pamiętać, że w typowych PC markery mezenchymalne mogą być również dodatnie (19), (33), (37). Różnicowanie z płucnym *blastoma* opiera się na znalezieniu utkania płodowego raka gruczołowego i prymitywnego mezenchymalnego podścieliska.

W przypadkach guzów obwodowych, szczególnie naciekających ścianę klatki piersiowej, w różnicowaniu należy uwzględnić przede wszystkim międzybłoniaka opłucnej (ang. *mesothelioma*). Reakcje immunohistochemiczne w większości przypadków pozwalają na postawienie rozpoznania, a w przypadkach wątpliwych pomocne mogą być dane kliniczne

i obraz radiologiczny (35), (37), (39). Inne rzadkie nowotwory w tej lokalizacji to: zlokalizowany guz włóknisty (ang. *solitary fibrous tumor*) i mięsak maziówkowy (ang. *synovial sarcoma*) (37).

W przypadku nowotworów płuca o wyglądzie nabłonkowatym i/lub wrzecionowatokomórkowym, przy ujemnym odczynie na cytokeratyny, należy rozszerzyć panel immunohistochemiczny o markery charakterystyczne dla czerniaka (ang. *malignant melanoma*) (19), (37).

Komponent olbrzymiokomórkowy w raku wielopostaciowym może nasuwać podejrzenie kosmówczaka (ang. *choriocarcinoma*) (18), (37).

Rak wielopostaciowy z dominującym komponentem wrzecionowatokomórkowym i rak wrzecionowatokomórkowy z towarzyszącym intensywnym odczynem zapalnym w podścielisku, wymagają różnicowania z miofibroblastycznym guzem zapalnym (ang. *inflammatory myofibroblastic tumor*) oraz ziarniniakiem martwiczym (ang. *pulmonary necrotizing granuloma*), w czym także pomagają badania immunohistochemiczne (37).

Rak wielopostaciowy, szczególnie z różnicowaniem płaskonabłonkowym, czasami może tworzyć szczelinowate, naczyiniopodobne przestrzenie przypominające utkanie nabłonkowatych mięsaków naczyiniowych (ang. *angiosarcoma*, *haemangioendothelioma*), które często wykazują dodatnią reakcję z cytokeratynami (37). Ustalenie rozpoznania wymaga diagnostyki IHC z wykorzystaniem panelu przeciwciał.

Mięsaki płuc są bardzo rzadkimi nowotworami i dlatego w przypadku morfologii mięsakowatej, szczególnie gdy obraz morfologiczny, immunohistochemiczny i/lub molekularny nie jest typowy dla określonego typu mięsaka, należy zawsze myśleć o raku wielopostaciowym, nawet w przypadku ujemnych markerów nabłonkowych (37).

1.9 Badania molekularne

Rak wielopostaciowy charakteryzuje się dużą liczbą mutacji (ang. *tumor mutational burden*, TMB), średnio 8.1 mutacji/Mb, podobnie jak inne raki związane z paleniem tytoniu (19), (40). W około 70-80% przypadków stwierdza się minimum jedną mutację, a w ok. 40% dwie lub więcej, przy czym większą liczbę mutacji stwierdzano przy współistniejącym utkaniu raka gruczołowego niż płaskonabłonkowego (36), (40), (41). Do najczęstszych istotnych

kliniycznie mutacji stwierdzonych przy użyciu różnych metod molekularnych należą: *KRAS* (27-39%), *EGFR* (9-22%), *TP53* (23-74%), *BRAF* (7%), *HER2* (1,6%), natomiast mutacje w genie *ALK* i *ROS1* są bardzo rzadkie (17), (36), (40), (41), (42), (43). Mutacje te nie są specyficzne dla raka wielopostaciowego i występują także w innych postaciach NSCLC. Jedyną mutacją, która wydaje się występować częściej w raku wielopostaciowym niż w innych NSCLC jest mutacja w eksonie 14 genu *MET*, którą stwierdza się w ok. 11-32% (40), (41), (43), (44). Aktywacja szlaku sygnałowego *MET* jest związana z transformacją nabłonkowo-mezenchymalną (19), (23).

1.10 Ekspresja PD-L1

Cząsteczka PD-L1 (CD274, B7-H1) (ang. *programmed death-ligand 1*) jest białkiem błonowym występującym na powierzchni różnych komórek biorących udział w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, a także na powierzchni komórek wielu nowotworów. Jest ona jednym z czynników aktywujących cząsteczkę PD-1 (CD279), czyli receptor programowanej śmierci komórek, odpowiedzialny za przekazanie sygnału hamującego aktywność limfocytów („ujemny” punkt kontroli układu immunologicznego). W wyniku pobudzenia cząsteczki PD-1 dochodzi do wyczerpania funkcjonalnego limfocytów, do aktywacji wewnątrzkomórkowych szlaków odpowiedzialnych za produkcję immunosupresyjnych cytokin oraz za apoptozę limfocytów (45). Zjawisko to jest jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za ucieczkę komórek nowotworowych spod nadzoru immunologicznego.

Poznanie mechanizmów immunologicznych towarzyszących rozwojowi nowotworów pozwoliło na opracowanie metod immunoterapii opartych na modyfikacji stanu immunologicznego w celu jego stymulacji do aktywnej i efektywnej walki z nowotworem. Zastosowanie przeciwciał przeciwko PD-1 i PD-L1 prowadzi do reaktywacji funkcji cytotoksycznej limfocytów T. Immunoterapia przeciwko PD-1 i PD-L1 w przypadkach NSCLC w stadium uogólnienia przyczynia się do poprawy stanu pacjenta, zahamowania wzrostu, a nawet remisji nowotworu (27), (46). Ekspresja PD-L1 na komórkach nowotworowych, oceniana metodą immunohistochemiczną jako dodatni odczyn błonowy w minimum 1% komórek, jest jedynym zwalidowanym czynnikiem predykcyjnym w kwalifikacji do immunoterapii chorych na zaawansowanego NSCLC (45), (46).

W raku wielopostaciowym ekspresja PD-L1 jest obserwowana w ok. 50 do 90% przypadków, w zależności od przyjętych kryteriów reakcji dodatniej (38), (47), (48), (49), (50),

(51), (52), (53), (54) i jest wyższa w porównaniu z innymi postaciami NSCLC 69,2% vs 27,4% (48) i 53% vs 20% (50). Podobnie jak w innych NSCLC, prognostyczne znaczenie ekspresji PD-L1 w raku wielopostaciowym pozostaje nieustalone (38), (47), (50), (51).

Wykazano, że zwiększona ekspresja PD-L1 może być związana z procesami przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT) (55), (56). W niektórych badaniach zaobserwowano, że ekspresja PD-L1 w komórkach różnych raków niedrobnokomórkowych płuca korelowała z ekspresją białek związanych z EMT takich jak: E-kadheryna, wimentyna, ZEB1 (55), (56). Zależności te nie były badane w rakach wielopostaciowych.

1.11 Szerzenie się raka przestrzeniami powietrznymi - STAS

W klasyfikacji WHO nowotworów płuca z roku 2015 wprowadzono pojęcie szerzenia się nowotworu przestrzeniami powietrznymi (ang. *spread through air spaces*, STAS) (11). Zjawisko to zostało zdefiniowane jako: „szerzenie się drobnobrodawkowatych grup, litych gniazd lub pojedynczych komórek przestrzeniami powietrznymi miąższu płuca poza brzegiem/granicą głównego guza”. Definicja ta wprowadza całkowicie nowy typ inwazji nowotworu, niezwiązany z destrukcją błony podstawnej, podścieliska lub innych struktur anatomicznych tj. naczyń limfatycznych, krwionośnych, nerwów czy opłucnej.

Zjawisko szerzenia się przestrzeniami powietrznymi zostało pierwotnie opisane w rakach gruczołowych płuca, w których częstość STAS wahała się od 14,8 % do 56,4% (57), (58), (59), (60). Następnie stwierdzono jego występowanie w rakach płaskonabłonkowych (30-40%) (61), (62) oraz w nowotworach neuroendokrynnych (26%), w tym raku drobnokomórkowym (46%) (63).

Do tej pory opublikowano jedynie jedno badanie dotyczące STAS w raku wielopostaciowym. Badanie obejmowało 35 przypadków (64). STAS stwierdzono u 40% chorych. Jego obecność była związana ze znamienne gorszym przeżyciem wolnym od nawrotu (DFS) oraz całkowitym przeżyciem (ang. *overall survival*, OS), była także niezależnym czynnikiem ryzyka nawrotów i krótszego przeżycia całkowitego.

Obecnie STAS jest uważany za ważny czynnik prognostyczny.

1.12 Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna

Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna (EMT) jest znanym zjawiskiem, w którym spolaryzowane, stacjonarne komórki nabłonkowe ulegają przekształceniu w komórki mezenchymalne charakteryzujące się większą zdolnością do migracji, inwazji, produkcji substancji zewnątrzkomórkowej i większą odpornością na apoptozę (4), (5). Proces ten odgrywa kluczową rolę w procesie embriogenezy, w gojeniu ran, procesach włóknienia, a także w progresji nowotworów. Uważa się, że EMT jest jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za naciekanie, tworzenie przerzutów, a także za oporność komórek nowotworowych na leczenie (4), (5), (19), (23), (65). Raki mięsakowate w różnych narządach, także w płucach, są przykładem nowotworów, w których EMT odgrywa istotną rolę, aczkolwiek geneza tego zjawiska nie jest do końca wyjaśniona. Prawdopodobnie nie jest to jedyny mechanizm powstawania tych nowotworów (4), (5), (19), (28), (65), (66), (67).

Istotną rolę w aktywacji procesu EMT odgrywa czynnik transkrypcyjny ZEB1 (*ang. zinc-finger E-box binding homebox 1*), który hamuje transkrypcję E-kadheryny, co wykazano w licznych pracach eksperymentalnych, w rakach mięsakowatych różnych narządów (68), (69), (70), (71) (72), (73) oraz w pojedynczych badaniach obejmujących raki mięsakowate płuca (74), (75).

ZEB1 wpływa także na mikrośrodowisko guza i ekspresję ujemnych punktów kontroli immunologicznej (55), (68), (71), (72), (76), (77), (78).

W badaniach molekularnych wykazano, że w wielu nowotworach EMT jest czynnikiem prognostycznym (5), (77), jednak w przypadku raków płuca rola ta nie jest jednoznaczna (70), (78), (79). W pracach tych nie uwzględniano odrębnie raków wielopostaciowych.

Ekspresja markerów EMT w rakach mięsakowatych i raku wielopostaciowym płuca była oceniana immunohistochemicznie w nielicznych pracach, dlatego jej wartość diagnostyczna pozostaje nieustalona (67), (74), (75).

1.13 Leczenie

Najskuteczniejszym leczeniem raka wielopostaciowego, podobnie innych postaci NSCLC, jest leczenie operacyjne. Najczęściej wykonuje się lobektomię z usunięciem

regionalnych węzłów chłonnych. W przypadkach zmian nieoperacyjnych stosuje się chemioterapię lub chemioterapię połączoną z radioterapią, rzadziej leczenie neoadjuwantowe, w zależności od stopnia zaawansowania choroby.

W przypadku stwierdzenia komponentu raka gruczołowego w utkaniu raka konieczne jest badanie mutacji w genie *EGFR* oraz rearanżacji genu *ALK* i *ROS1* (11). Wyniki stosowania standardowej chemioterapii opartej na pochodnych platyny, zarówno przed- jak i pooperacyjnej są jednak kontrowersyjne. Nie ma ustalonych schematów postępowania, a obserwowane odpowiedzi na leczenie nie są satysfakcjonujące (6), (10), (14), (23), (80). Dołączenie radioterapii do klasycznej chemioterapii nie miało wpływu na całkowite przeżycie (16).

Rozwój terapii ukierunkowanej molekularnie jaki dokonał się w ostatnich latach w leczeniu NSCLC dawał nadzieję, że będzie ona możliwa także u chorych z rozpoznany rakiem wielopostaciowym. Jednak pomimo stwierdzenia różnych mutacji w komórkach raka - *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *PIK3CA*, *HER2* - potencjalnie stanowiących cel terapii, ich częstość jest niższa niż w innych postaciach NSCLC, co przy niewielkiej liczbie przypadków utrudnia prowadzenie badań klinicznych i ustalenie efektywności terapii. Ponadto, mutacje genu *EGFR* stosunkowo często dotyczyły innych eksonów niż 18, 19 i 21, związanych z dobrą odpowiedzią na leczenie celowane. Odpowiedź na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej w opublikowanych pojedynczych przypadkach lub niewielkich grupach pacjentów nie była zadowalająca (6), (47), (81), (82). Uważa się, że jest to związane z aktywacją w rakach wielopostaciowych mechanizmów transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej, które - przynajmniej w części przypadków - są odpowiedzialne za oporność nowotworów na działanie inhibitorów kinazy tyrozynowej (65). Ponadto najczęstszymi mutacjami stwierdzanymi w rakach wielopostaciowych są mutacje w genie *KRAS* i *TP53* co, jak na razie, ogranicza możliwości zastosowania terapii celowanej (40), (41). Obecnie nadzieję pokłada się w inhibitorach genu *MET*, ze względu na większą częstość tej mutacji w rakach wielopostaciowych niż w innych postaciach NSCLC (19), (77), (83).

Wprowadzona niedawno terapia inhibitorami punktów kontroli immunologicznej do leczenia wielu nowotworów wydaje się obiecującą alternatywą, szczególnie, że w raku wielopostaciowym ekspresja PD-L1 jest wyższa niż w innych postaciach NSCLC. Ostatnio opublikowane badania dotyczące leczenia chorych z PC wykazały wysoką skuteczność terapii inhibitorami PD1/PD-L1. Obiektywną odpowiedź na leczenie w postaci częściowej lub całkowitej remisji lub stabilizacji choroby uzyskano u 49%-60% chorych (84), (85), (86).

2. Założenia pracy

Rak wielopostaciowy płuca jest rzadkim podtypem NSCLC o różnorodnym obrazie morfologicznym i immunofenotypie, o cechach różnicowania nabłonkowego i mezenchymalnego. Ze względu na rzadkość występowania dane dotyczące obrazu klinicznego, morfologicznego, a także czynników rokowniczych są zróżnicowane. Większość dotychczasowych badań opiera się na niedużych, maksymalnie kilkudziesięcioosobowych grupach chorych, co znacznie utrudnia analizę danych, wnioskowanie i wypracowanie strategii terapeutycznej dla tej grupy chorych. Brak jest także zbiorczych danych dotyczących populacji polskiej.

Rozpoznanie histopatologiczne PC opiera się na cechach morfologicznych nowotworu i nie zawsze wymaga wykonania badań immunohistochemicznych. Mogą być one jednak pomocne w określeniu podtypów morfologicznych, co może mieć wpływ na rokowanie, dalsze postępowanie diagnostyczne z materiałem, a w konsekwencji podjęcie decyzji terapeutycznych. Dane literaturowe na ten temat są bardzo zróżnicowane, a panel przeciwciał nieustalony.

Uważa się, że w powstawaniu raków wielopostaciowych kluczową rolę odgrywają procesy transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej, co manifestuje się zmianami w ekspresji substancji nazywanych markerami EMT m.in. E-kadheryny, wimentyny i ZEB1. Stopniowa utrata E-kadheryny jest związana z nasilającą się ekspresją ZEB1 i wimentyny, co zaobserwowano w badaniach molekularnych w rakach mięsakowatych innych narządów i jedynie w pojedynczych pracach dotyczących raków wielopostaciowych płuca. Nie jest jasne czy ekspresja tych markerów ma związek z cechami kliniczno-patologicznymi i rokowaniem w PC.

Klasyczne strategie terapeutyczne podejmowane obecnie u chorych z rakiem wielopostaciowym tj. standardowa chemio- i radioterapia, a także terapia ukierunkowana molekularnie, nie przyniosły satysfakcjonujących efektów. Obiecującą metodą leczenia wydaje się immunoterapia oparta na lekach blokujących ujemne punkty kontroli immunologicznej ze względu na wysoką ekspresję białka PD-L1 na komórkach PC. Wysoka ekspresja PD-L1 może mieć związek z przemianą nabłonkowo-mezenchymalną, typem różnicowania nabłonkowego oraz z agresywniejszym przebiegiem nowotworu, ale wyniki w piśmiennictwie są trudne do porównania.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na negatywny wpływ szerzenia się raka przestrzeniami powietrznymi (STAS) na przebieg choroby. Do tej pory ukazała się jedynie jedna praca dotycząca STAS w raku wielopostaciowym, gdzie wykazano ujemny wpływ tego zjawiska na rokowanie (64). Badana grupa obejmowała jedynie 35 przypadków, wyłącznie z towarzyszącym zróżnicowanym komponentem nabłonkowym. Nie analizowano związku STAS z typem i rozległością komponentu mezenchymalnego, ekspresją markerów nabłonkowych czy podścieliskowych, a także z ekspresją białka PD-L1.

3. Cel pracy

Celem pracy była retrospektywna analiza grupy chorych z rozpoznaniem raka wielopostaciowego, raka wrzecionowatokomórkowego i olbrzymiokomórkowego płuca, korelacja cech morfologicznych, immunofenotypu z danymi klinicznymi oraz określenie czynników predykcyjnych i prognostycznych.

W związku z tym, w pracy została przeprowadzona:

1. Analiza morfologiczna raków wielopostaciowych, wrzecionowatokomórkowych i olbrzymiokomórkowych, określenie cech histologicznych: rodzaju i ilości komponentów nabłonkowego i mięsakowatego, ocena rozległości martwicy, nasilenia nacieku zapalnego, obecności zatorów z komórek raka w świetle naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz naciekania opłucnej.
2. Ocena immunofenotypu w oparciu o odczyny immunohistochemiczne: AE1/AE3, TTF1, p40, E-kadheryna, wimentyna i ZEB1.
3. Ocena ekspresji białka PD-L1 w komponencie nabłonkowym i mięsakowatym badanych raków, korelacja z typem histologicznym i immunofenotypem oraz ekspresją E-kadheryny, wimentyny i ZEB1.
4. Analiza zjawiska szerzenia się raka przestrzeniami powietrznymi (STAS), korelacja z ekspresją białka PD-L1 oraz ekspresją E-kadheryny, wimentyny i ZEB1.
5. Ustalenie czynników prognostycznych i predykcyjnych, które mogą mieć istotne znaczenie dla określenia przebiegu choroby i dalszego leczenia pacjenta.

4. Materiał i metody

4.1 Materiał

Retrospektywnym badaniem objęto 123 pacjentów operowanych z powodu nowotworu płuca w latach 2000-2019 w Klinice Chirurgii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, u których w Zakładzie Patomorfologii rozpoznano: raka sarkomatoidnego, pleomorficznego, wrzecionowatokomórkowego lub olbrzymiokomórkowego. Po powtórnych obejrzeniu preparatów mikroskopowych 5 przypadków zakwalifikowano jako mięsakoraki, ze względu na obecność heterologicznego utkania mięsaka, 2 przypadki zdiagnozowano jako złożony rak niedrobnokomórkowy neuroendokrynnny (ang. *combined large cell neuroendocrine carcinoma*) ze względu na obecność komponentu raka neuroendokrynnego potwierdzonego badaniem immunohistochemicznym. Wszystkie przypadki zreklasyfikowane wyłączono z badania. Dodatkowo po analizie danych klinicznych z badania wyłączono 7 pacjentów, którzy przed zabiegiem operacyjnym otrzymali chemioterapię neoadjuwantową oraz jednego pacjenta po chemioterapii adjuwantowej (z powodu raka jelita grubego) przebytej rok przed operacją guza płuca. Jeden przypadek wyłączono z powodu braku blozków parafinowych. Ostatecznie do badania włączono 107 przypadków.

4.2 Metody

4.2.1 Dane kliniczne

Dane kliniczne uzyskane z bazy informatycznej IGiChP obejmowały: wiek, płeć, objawy kliniczne, palenie papierosów, rodzaj wykonanej operacji, datę zabiegu operacyjnego, datę wystąpienia nawrotu choroby, rodzaj nawrotu: wznowa miejscowa, przerzuty regionalne i/lub odległe, data ostatniej wizyty, data zgonu. Dane na temat daty zgonu dodatkowo uzupełniono w oparciu o informacje otrzymane z Powszechnego Elektronicznego Systemu Ewidencji Ludności. Za moment zakończenia obserwacji przyjęto datę sporządzenia zestawienia z bazy PESEL tj. 30.06.2020r. Ponadto z Krajowego Rejestru Raka Płuca (KRRP) uzyskano liczbę zarejestrowanych, operowanych w tym okresie raków ogółem, z uwzględnieniem podtypu raka wielopostaciowego (pleomorficznego i sarkomatoidnego). Z Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) uzyskano informacje na temat zgłoszonych raków wielopostaciowych w Polsce.

Lokalizację zmiany i jej wielkość ustalano na podstawie rozpoznania patomorfologicznego zawierającego opis makroskopowy.

Przyjęto następujące wskaźniki kliniczne:

- przeżycie całkowite (OS) - czas przeżycia od daty operacji do daty zgonu, bez względu na przyczynę zgonu, lub do daty zakończenia obserwacji (tj. 30.06.2020);
- przeżycie wolne od choroby (DFS) - czas od daty operacji do daty stwierdzenia obiektywnego nawrotu choroby w jakiegokolwiek postaci lub daty zgonu, bądź daty zakończenia obserwacji (tj. 30.06.2020).

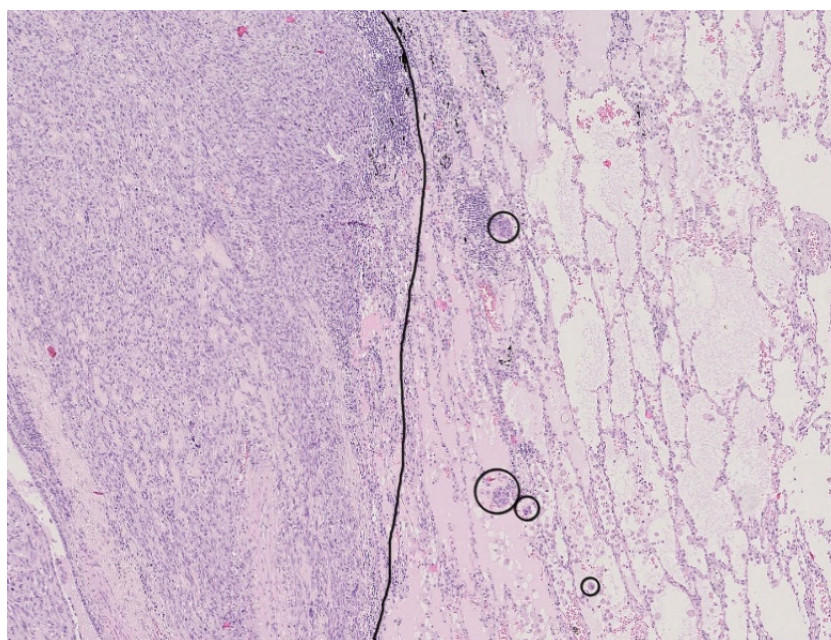
4.2.2 Badanie histologiczne

Materiał histopatologiczny obejmował preparaty mikroskopowe barwione hematoksyliną i eozyną oraz dodatkowe badania histochemiczne i immunohistochemiczne. W każdym przypadku dostępne były wszystkie preparaty z materiału operacyjnego, w tym wycinki z guza. W 99 przypadkach pobrane wycinki zawierały brzeg guza z przylegającym mięszem płuca do oceny STAS. W 8 przypadkach nie można było ocenić STAS ze względu na zbyt wąski margines otaczającego mięszu lub lokalizację wewnątrzoskrzelową, bez cech naciekania mięszu płuca. Po powtórnej ocenie preparatów mikroskopowych, w połączeniu z badaniem immunohistochemicznym, ustalano podtyp histologiczny raka występujący w guzie i typ utkania mięsakowego. Materiał reklasyfikowano zgodnie z klasyfikacją nowotworów płuca, opłucnej, grasicy i serca WHO z 2015r. Stosowane kryteria oceny nie różniły się od zawartych w aktualnej klasyfikacji guzów klatki piersiowej z 2021r. W przypadku występowania dwóch i więcej komponentów utkanie określano jako mieszane. Stopień zaawansowania choroby we wszystkich przypadkach oceniano wg obowiązującej klasyfikacji TNM z 2017r. (edycja 8) (załącznik 1).

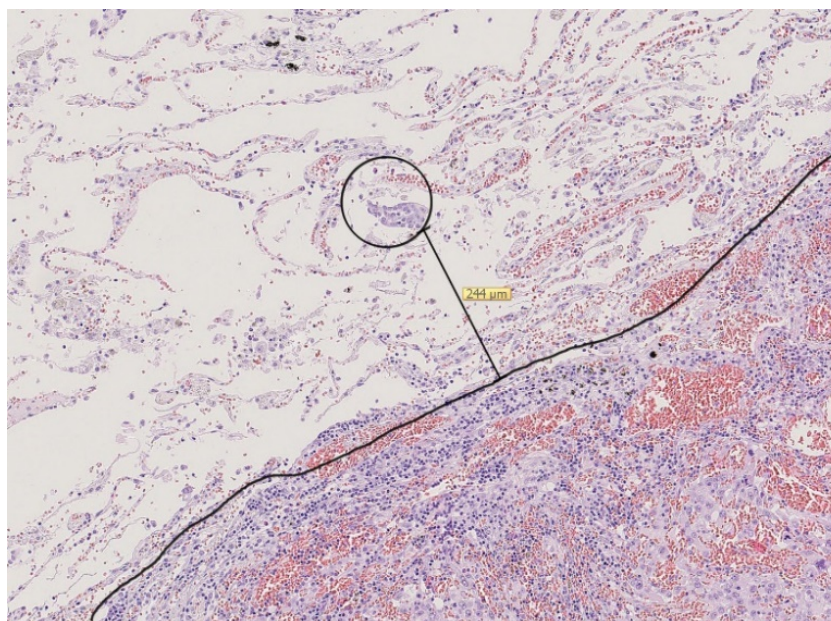
W każdym przypadku dodatkowo oceniano:

- typ utkania nabłonkowego i mięsakowego, z szacunkową oceną ich rozległości;
- obecność inwazji naczyń rozumianą jako obecność zatorów z komórek raka w naczyniach krwionośnych (ang. *blood vessels invasion*, BVI) i limfatycznych (ang. *lymphatic vessels invasion*, LVI);
- naciekanie opłucnej;

- rozległość pól martwicy wg skali: 0 - brak martwicy lub drobne ogniska $\leq 10\%$; 1 - pola martwicy do 25%; 2 - pola martwicy do 50%; 3 - rozległe pola martwicy obejmujące powyżej 50% guza;
- nacieki zapalne i ich nasilenie wg skali: 0 skąpe - nieliczne komórki limfo-plazmocytarne rozproszone w obrębie guza, widoczne pod powiększeniem x10; 1 słabo nasilone - komórki limfo-plazmocytarne widoczne pod powiększeniem x10 w postaci drobnych skupień, nie w każdym polu widzenia, 2 średnio nasilone - komórki limfo-plazmocytarne lub granulocyty obojętnochłonne widoczne rozproszone lub w drobnych skupieniach pod powiększeniem x10 w każdym polu widzenia, 3 intensywne - nasilony naciek limfo-plazmocytarny widoczny pod powiększeniem x4;
- szerzenie się raka drogami powietrznymi (STAS). Oceniano miąższ płucny z brzegiem guza pod powiększeniem x100. Brzeg guza wyznaczano prowadząc umowną, zakrzywioną linię (fot. 12, fot. 13). Za zmiany STAS uznawano: luźno leżące drobnobrodawkowate grupy, lite gniazda lub pojedyncze komórki nowotworowe w świetle przestrzeni powietrznych miąższu, poza brzegiem głównego guza, bez względu na odległość od brzegu, także w pierwszej przestrzeni powietrznej (11).

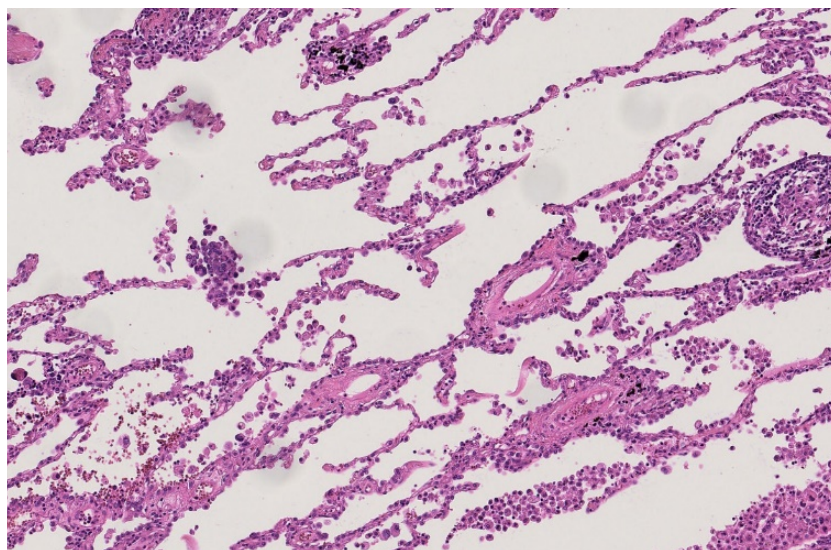


Fot. 12 STAS. Brzeg guza oznaczono ciągłą linią. Grupy i pojedyncze komórki raka w przestrzeniach powietrznych oznaczone okręgami. Barwienie HE, pow. x50



Fot. 13 STAS. Oznaczenia jw. Barwienie HE, pow. x100

Ułożone przypadkowo, rozproszone grupy komórek o ostrych brzegach lub grupy, komórki gromadzące się na brzegu preparatu oraz linijnie układające się komórki odłuszczone od ściany pęcherzyków były uznawane za artefakty (fot. 14).



Fot. 14 Artefakty. Barwienie HE, pow. x100

Dodatkowo określano liczbę ognisk STAS wg zasad zaproponowanych przez Uruga i wsp. (59) tj. po wybraniu pól z największą liczbą STAS oceniano ich liczbę pod powiększeniem x200 w reprezentatywnym polu widzenia. Materiał był kwalifikowany jako: brak STAS, niski STAS (ang. *low STAS*, ls) gdy liczba gniazd, struktur brodawkowatych lub

pojedynczych komórek wynosiła 1-4 w polu widzenia oraz wysoki STAS (ang. *high STAS*, hs) gdy wynosiła 5 lub więcej.

4.2.3 Badanie immunohistochemiczne

Z każdego przypadku wybierano bloczek lub dwa bloczki parafinowe zawierające reprezentatywne utkanie nabłonkowe i mięsakowate. Wszystkie odczyny wykonywano tą samą metodą: skrawki parafinowe grubości 3,5µm umieszczano na szkiełkach silanizowanych, po procesie wygrzewania w cieplarni w temp 60°C przez 30 minut, poddawano standardowemu opracowaniu w procesorze Benchmark UltraGX ROCHE przy zastosowaniu zestawu detekcyjnego: ultraView Universal DAB Detection Kit ROCHE. Reakcje z przeciwciałami gotowymi do użycia przeprowadzono wg zalecanej procedury producenta, a z przeciwciałami PD-L1 i ZEB1 w oparciu o opracowany i zwalidowany laboratoryjnie protokół postępowania. Badania wykonywano z kontrolą pozytywną zewnętrzną lub wewnętrzną, a w przypadku oceny ekspresji PD-L1 także z kontrolą negatywną. W przypadku wątpliwości co do wiarygodności reakcji, badanie powtarzano na świeżo skrojonym skrawku.

W każdym przypadku zastosowano ten sam panel przeciwciał przeciwko badanym antygenom:

- AE1/AE3 - mieszanka cytokeratyn o szerokim spektrum, czyli nierozpuszczalnych w wodzie białek fibrylarnych stanowiących podstawę cytoszkieletu komórki, wytwarzanych przez komórki nabłonkowe prawidłowe i nowotworowe;
- E-kadheryna - kadheryna nabłonkowa - jedno z białek przezbłonowych odpowiedzialnych za adhezję komórkową, czyli tworzenie połączeń między komórkami nabłonkowymi i ich wzajemne przyleganie;
- TTF1 - (ang. *thyroid transcription factor 1*) - białko transkrypcyjne regulujące morfogenezę nabłonka płucnego i rozwój tarczycy, obecne w komórkach raka gruczołowego płuc;
- p40 - izoforma p63, należąca do rodziny genów supresorowych p53, występująca przede wszystkim w nabłonku wielowarstwowym płaskim, w tym w komórkach raka płaskonabłonkowego;
- wimentyna - podstawowe białko filamentów pośrednich, obecne w komórkach pochodzenia mezenchymalnego;
- PD-L1 - ligand receptora programowanej śmierci komórek (ang. *programmed death-ligand 1*), białko błonowe występujące na powierzchni komórek immunokompetentnych i nowotworowych, które prowadzi do aktywacji cząsteczki PD-1 (CD279), czyli receptora

programowanej śmierci komórek, odpowiedzialnego za przekazanie sygnału hamującego aktywność limfocytu;

- ZEB1 - czynnik transkrypcyjny działający jako czynniki hamujący ekspresję E-kadheryny, przez co indukuje i promuje przemianę nabłonkowo-mezenchymalną.

Charakterystykę stosowanych przeciwciał przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Charakterystyka stosowanych przeciwciał

Przeciwciało	Producent/ klon	Typ p/ciała	Forma p/ciała	Typ reakcji	Rodzaj kontroli dodatniej
AE1/AE3	ROCHE	Poliklonalne/ mieszanina cytokeratyny AE1, AE3, PCK26	RTU (ang. <i>ready to use</i>)	Cytoplazmaty- czna i błonowa	Kontrola wewnętrzna - nabłonek oskrzelowy i pęcherzyków płucnych
E-kadheryna	VENTANA	Monoklonalne/ 36	RTU	Cytoplazmaty- czna i błonowa	Pierś
TTF-1	ROCHE	Monoklonalne/ SP141	RTU	Jądrowa	Tarczycza
p40	ROCHE	Monoklonalne/ BC28	RTU	Jądrowa	Migdałek
Wimentyna	CONFIRM	Monoklonalne/ V9	RTU	Cytoplazmaty- czna i błonowa	Kontrola wewnętrzna
PD-L1	PERLAN	Monoklonalne/ 22C3	Stężone Rozcień- czenie 1:50	Błonowa	Łożysko
ZEB1	Invitrogen	Poliklonalne/ PA5-96366	Stężone/ Rozcień- czenie 1:400	Jądrowa	Rak piersi

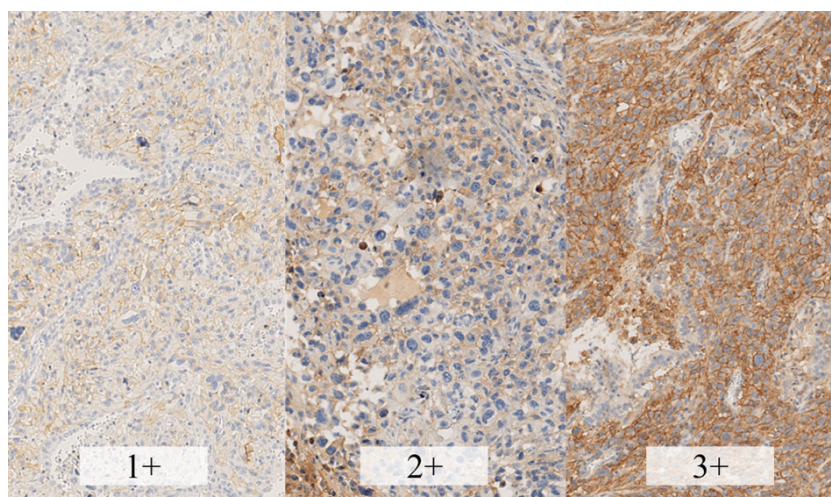
Ekspresję antygenów oceniano w mikroskopie świetlnym - Olympus BX 53, oddzielnie dla komponentu nabłonkowego i mięsakowego.

Odczyny immunohistochemiczne, z wyjątkiem ekspresji białka PD-L1, oceniano wg następujących zasad:

- za dodatnią reakcję uznawano obecność brązowego zabarwienia w obrębie komórek nowotworowych we właściwej dla danego antygeny lokalizacji;
- nasilenie zabarwienia oceniano wg trójstopniowej skali: 1 - słabe (widoczne dopiero przy użyciu powiększenia x100); 2 - średnie (widoczne przy powiększeniu x40); 3 - silne (wyraźnie widoczne przy powiększeniu x40) (74);
- rozległość reakcji oceniano szacując liczbę zabarwionych komórek wg schematu: 0pkt 0-9%; 1pkt 10-25%; 2pkt 26-50%; 3pkt 51-75%; 4pkt 76-100% (12), (34);
- w celu zmniejszenia wpływu subiektywizmu na ocenę, za dodatni odczyn uznawano przypadki, gdy iloczyn nasilenia i rozległości wynosił ≥ 2 (74),
- w ostatecznej ocenie odczynu przyjęto: za niską ekspresję, jeśli iloczyn nasilenia i rozległości wynosił < 8 , a za wysoką ekspresję jeśli był ≥ 8 (74).

Ocenę PD-L1 przeprowadzono wg następujących zasad:

- za dodatnią reakcję uznawano obecność brązowego zabarwienia w obrębie błony komórkowej komórek nowotworowych, bez względu na stopień nasilenia reakcji (1+, 2+, 3+) (fot. 15);
- oceniano odsetek komórek raka wykazujących jakikolwiek dodatni odczyn błonowy w stosunku do wszystkich komórek raka widocznych w preparacie (ang. *Tumor Proportion Score*, TPS);
- wyniki interpretowano jako: odczyn ujemny, gdy $TPS < 1\%$, odczyn słaby, gdy TPS wynosił 1-49% oraz silny gdy $TPS \geq 50\%$.



Fot. 15 Nasilenie reakcji z przeciwciałem PD-L1. Pow. x100

4.2.4 Metody statystyczne

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie R, wersja 4.0.3 (87).

Analizę zmiennych ilościowych (tj. wyrażonych liczbą) przeprowadzono wyliczając średnią, odchylenie standardowe, medianę, kwartyle, minimum oraz maksimum.

Analizę zmiennych jakościowych (tj. niewyrażonych liczbą) przeprowadzono wyliczając liczbę i procent wystąpień każdej z wartości.

Porównanie wartości zmiennych jakościowych w grupach wykonano za pomocą testu chi-kwadrat (z korektą Yatesa dla tabel 2x2) lub dokładnego testu Fishera tam, gdzie w tabelach pojawiały się niskie licznosci oczekiwane.

Porównanie wartości zmiennych ilościowych w dwóch grupach wykonano za pomocą testu Manna-Whitney'a.

Porównanie wartości zmiennych ilościowych w trzech i więcej grupach wykonano za pomocą testu Kruskala-Wallisa. Po wykryciu istotnych statystycznie różnic wykonywano analizę post-hoc testem Dunna w celu zidentyfikowania różniących się istotnie statystycznie grup.

Porównanie krzywych Kaplana-Meiera wykonano za pomocą testu LR (log-rank).

Analizę wpływu zmiennych ilościowych na czasy przeżyć (OS i DFS) wykonano za pomocą modelu hazardów proporcjonalnych Coxa. Wyniki przedstawiono w postaci wartości parametrów HR z 95-procentowym przedziałem ufności.

W analizie przyjęto poziom istotności 0,05, a więc wszystkie wartości p poniżej 0,05 interpretowano jako świadczące o istotnych zależnościach.

5. Wyniki

5.1 Dane kliniczne

Badaną grupę stanowiło 107 chorych, w tym 67 mężczyzn i 40 kobiet. Pacjenci mieli od 38 do 82 lat, średnia wieku wynosiła 64,3 lata i była zbliżona w grupie kobiet - 64,5 lat i mężczyzn - 64,2 lata. Mediana wieku dla całej populacji oraz oddzielnie dla grupy kobiet i mężczyzn wyniosła 65 lat.

W okresie 2000–2020 w Krajowym Rejestrze Raków Płuca zarejestrowano 8002 przypadków operowanych raków płuc, w tym 131 przypadków raka pleomorficznego lub sarkomatoidnego, co stanowi 1,6%.

W Krajowym Rejestrze Nowotworów w okresie 2000-2017 zarejestrowano 168 przypadków raka wielopostaciowego oraz 12 raka olbrzymio- i wrzecionowatokomórkowego. W przeważającej większości nie było informacji nt. stopnia zaawansowania (94% przypadków) oraz leczenia (70% przypadków), co uniemożliwiało wykorzystanie uzyskanych informacji do dalszej analizy.

Dane dotyczące objawów klinicznych dostępne były w historii choroby u 101 chorych, przy czym większość osób (ok. 75%) zgłaszała więcej niż jeden objaw. Najczęściej pacjenci skarżyli się na kaszel (35), krwioplucie (26), osłabienie i zmniejszenie tolerancji wysiłku (23), ból w klatce piersiowej (20), spadek masy ciała (19), stany podgorączkowe (18), duszność (13). Jedynie u dwóch osób powodem rozpoczęcia diagnostyki były nawracające lub przedłużające się zapalenia płuc. Inne rzadkie objawy to: pocenie - 1 i bóle barku - 2 przypadki. Jeden pacjent został przyjęty do szpitala z powodu powtarzających się epizodów nagłego zatrzymania krążenia, co było związane z okresowym zamknięciem oskrzela głównego przez guz wewnątrzoskrzelowy. Dwudziestu sześciu (ok. 26%) pacjentów nie zgłaszało żadnych dolegliwości, guz płuca wykryto przypadkowo w trakcie diagnostyki innych chorób lub w ramach rutynowych badań kontrolnych pracowniczych, bądź zlecanych przed wyjazdem do sanatorium.

Dane dotyczące palenia papierosów dostępne były u 81 pacjentów, z czego jedynie 6 osób (7,4%) nigdy nie paliło, a kolejne 22 nie paliło od minimum roku (tj. od 2-30 lat). Aktywnymi palaczami pozostawało 53 chorych. Liczba wypalanych paczek papierosów wahała się od 10 do 100 i wynosiła średnio ok. 44 paczki papierosów, mediana 40. Jeden chory zgłaszał dodatkowo

narażenie na działanie azbestu, ale w historii choroby nie znaleziono bardziej szczegółowych informacji dotyczących czasu narażenia.

U 61 chorych (57%) nowotwór był zlokalizowany w prawym płucu, a u 46 (43%) w lewym, najczęściej w płatach górnych - 55 przypadków (51,4%), rzadziej w płatach dolnych - 39 (36,4%), jedynie w 3 przypadkach (2,8%) w płacie środkowym oraz w 3 w płacie środkowym i dolnym (2,8%). W większości przypadków (78,5%) nowotwór położony był obwodowo, tylko u 7 pacjentów znajdował się wewnątrzoskrzelowo (6,5%).

Najczęstszym zabiegiem operacyjnym była lobektomia z usunięciem węzłów regionalnych - 93 przypadki (86,9%), a następnie pneumonektomia - 10 (9,4%). Jedynie u trzech pacjentów wykonano bilobektomię (2,8%), u jednego chorego tumorektomię (0,9%). U 11 chorych (10,3%) operacja nie była radykalna i w badaniu mikroskopowym stwierdzano zajęcie marginesów chirurgicznych (R1).

Dane dotyczące okresu po zakończonym leczeniu operacyjnym były dostępne u 70 pacjentów, z czego wznowa miejscowa wystąpiła u 8 chorych, a przerzuty odległe u 23 chorych. Czas do wystąpienia wznowy wynosił średnio 2,6 lat (SD=2,21), a do wystąpienia przerzutów 1,24 lata (SD=1,63). Wyniki przedstawiają tabela 3 oraz tabela 4.

Tabela 3. Czas od zabiegu operacyjnego do wystąpienia wznowy

Czas do wystąpienia wznowy [lata]								
N	Brak wznowy	Średnia	SD	Mediana	Min	Max	Q1	Q3
8	99	2,6	2,21	2,55	0,28	5,12	0,47	4,71

Tabela 4. Czas od zabiegu operacyjnego do wystąpienia przerzutów

Czas do wystąpienia przerzutów [lata]								
N	Brak przerzutów	Średnia	SD	Mediana	Min	Max	Q1	Q3
23	84	1,24	1,63	0,5	0*	5,14	0,35	1,02

*chora z rozpoznaniem przerzutem w trakcie hospitalizacji po operacji

U 3 chorych wznowie miejscowej towarzyszyły zmiany przerzutowe. W grupie pacjentów ze wznową jedynie 2 chorych (25%) było operowanych pierwotnie nieradykalnie z cechą R1, a w grupie chorych z przerzutami 4 chorych (17%). U jednej chorej przerzuty wykryto tuż po zabiegu operacyjnym. U 9 pacjentów stwierdzono przerzuty wieloogniskowe. Opisywane przerzuty występowały w: płucach (7), węzłach chłonnych klatki piersiowej (4), innych odległych grupach węzłów chłonnych (3), żebrach i ścianie klatki piersiowej (4), innych kościach (2), opłucnej (3), nadnerczach (4), wątrobie (3), jelicie cienkim (1), ośrodkowym układzie nerwowym (3).

5.2 Stopień zaawansowania

Średnica badanych guzów wahała się od 1,5 do 18cm i średnio wynosiła ok. 6cm, mediana 5,5cm.

Najliczniejszą grupę stanowiły guzy z cechą pT2 - 40 przypadków (37,4%), a następnie zmiany pT3 - 30 przypadków (28%) i pT4 - 33 (30,8%). Tylko 4 przypadki (3,7%) zostały zakwalifikowane do grupy pT1. U 45 chorych (42,1%) stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych regionalnych.

Najczęściej stwierdzono III stopień zaawansowania klinicznego (51,4% chorych). Stopnie I, II i IV występowały odpowiednio u: 16,8%, 30,8% i 0,9% chorych. Do analizy statystycznej połączono pacjentów w trzy grupy wg stopnia zaawansowania I-II-III/IV.

Stopnie zaawansowania patologicznego i klinicznego w badanej grupie chorych przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Stopnie zaawansowania patologicznego i klinicznego w badanej grupie chorych, wg klasyfikacji TNM 8 edycja, 2017 UICC

Parametr		Łącznie (N=107)
pT	pT1b	2 (1,87%)
	pT1c	2 (1,87%)
	pT2	1 (0,93%)
	pT2a	18 (16,82%)
	pT2b	21 (19,63%)
	pT3	30 (28,04%)
	pT4	33 (30,84%)
pN	pN0	61 (57,01%)
	pN1	28 (26,17%)
	pN2	17 (15,89%)
	pNx	1 (0,93%)
Stopień zaawansowania	IA2	2 (1,87%)
	IA3	2 (1,87%)
	IB	14 (13,08%)
	IIA	11 (10,28%)
	IIB	22 (20,56%)
	IIIA	44 (41,12%)
	IIIB	10 (9,35%)
	IIIC	1 (0,93%)
	IVA	(0,93%)

Nie stwierdzono statystycznie znamiennej zależności pomiędzy stopniem zaawansowania guza a płcią, wiekiem oraz umiejscowieniem w zależności od płata, strony oraz lokalizacji centralnej lub obwodowej ($p>0,05$). U 76 chorych (71%) stwierdzono naciekanie opłucnej, w tym u 38 pacjentów zdiagnozowano przekraczanie opłucnej trzewnej, a u 13 także naciekanie opłucnej ściennej.

5.3 Typy histologiczne utkania

W badaniu mikroskopowym obserwowano różnorodne utkania komponentu nabłonkowego i mięsakowego, przy czym wielokrotnie dokładne rozróżnienie obu komponentów było bardzo trudne. W przypadku obecności struktur umożliwiających określenie postaci morfologicznej raka, utkanie to nazwano „zróżnicowanym”. W 22 przypadkach nie znaleziono zróżnicowanego komponentu nabłonkowego. W 6 przypadkach obecne było utkanie kolizyjne raka gruczołowego i płaskonabłonkowego lub raka gruczołowo-płaskonabłonkowego, przypadki te ujęto w jedną grupę - typ mieszany. Udział poszczególnych typów utkania nabłonkowego w badanej grupie przedstawia tabela 6.

Tabela 6. Udział poszczególnych typów utkania nabłonkowego w badanych guzach

Typ utkania nabłonkowego	n	%
AC - rak gruczołowy	30	35,29%
LCC - rak wielkokomórkowy	10	11,76%
SCC - rak płaskonabłonkowy	39	45,88%
ME - mieszane utkanie nabłonkowe	6	7,06%

AC - rak gruczołowy (ang. *adenocarcinoma*), LCC - rak wielkokomórkowy (ang. *large cell carcinoma*), SCC - rak płaskonabłonkowy (ang. *squamous cell carcinoma*), ME - mieszane utkanie nabłonkowe: ACC i SCC lub rak gruczołowo-płaskonabłonkowy

Utkanie nabłonkowe stanowiło 1-90% guza, średnio ok. 35,6% (mediana 30), w 19 przypadkach (17,8%) było widoczne jedynie ogniskowo i stanowiło $\leq 10\%$.

Komponent mięsakowaty w większości przypadków (ok. 56%) składał się z mieszanego utkania wrzecionowato- i olbrzymiokomórkowego (tabela 7).

Tabela 7. Udział poszczególnych typów utkania mięsakowatego w badanych guzach

Typ utkania mięsakowatego	n	%
gc - utkanie olbrzymiokomórkowe	17	15,89%
sc - utkanie wrzecionowatokomórkowe	30	28,04%
ms - utkanie mieszane	60	56,07%

gc - utkanie olbrzymiokomórkowe (ang. *giant cell*), sc - utkanie wrzecionowatokomórkowe (ang. *spindle cell*), ms - utkanie mięsakowate mieszane gc i sc

Utkanie wrzecionowatokomórkowe występowało najczęściej w połączeniu z rakiem płaskonabłonkowym. Poza tym nie zaobserwowano wyraźnego związku typu zróżnicowanego komponentu nabłonkowego z typem komponentu mięsakowatego. W 5 przypadkach stwierdzono wyłącznie utkanie olbrzymiokomórkowe, w 2 tylko wrzecionowatokomórkowe, co odpowiada rozpoznaniu odpowiednio raka olbrzymiokomórkowego i wrzecionowatokomórkowego. Przypadki te włączono do grupy guzów bez zróżnicowanego komponentu nabłonkowego, wraz z guzami o wyłącznie mieszanym utkaniu mięsakowatym. Rozkład typów utkania nabłonkowego i mięsakowego przedstawia tabela 8.

Tabela 8. Rozkład typów utkania nabłonkowego i mięsakowego w badanych guzach

Typ utkania nabłonkowego	Typ utkania mięsakowatego		
	gc	sc	ms
AC	8 (7,48%)	5 (4,67%)	17 (15,89%)
LCC	0 (0,00%)	3 (2,80%)	7 (6,54%)
SCC	4 (3,74%)	17 (15,89%)	18 (16,82%)
ME	0 (0,00%)	3 (2,80%)	3 (2,80%)
Brak komponentu	5 (4,67%)	2 (1,87%)	15 (14,02%)

AC - rak gruczołowy (ang. *adenocarcinoma*), LCC - rak wielkokomórkowy (ang. *large cell carcinoma*), SCC - rak płaskonabłonkowy (ang. *squamous cell carcinoma*), ME - utkanie nabłonkowe mieszane: ACC i SCC lub rak gruczołowo-płaskonabłonkowy, gc - utkanie olbrzymiokomórkowe (ang. *giant cell*), sc - utkanie wrzecionowatokomórkowe (ang. *spindle cell*), ms - utkanie mięsakowate mieszane gc i sc

Nie stwierdzono korelacji typu histologicznego komponentu nabłonkowego oraz mięsakowatego a rozległością martwicy, stopniem naciekania opłucnej, inwazją naczyń

krwionośnych, obecnością lub brakiem STAS, ekspresją ZEB1, wielkością zmiany oraz stopniem zaawansowania ($p>0,05$). Inwazja naczyń limfatycznych występowała najczęściej w przypadkach raka mieszanego, a najrzadziej w raku wielkomórkowym ($p=0,028$). Typ utkania mięsakowatego nie miał istotnego związku z obecnością inwazji naczyń limfatycznych ($p=0,258$).

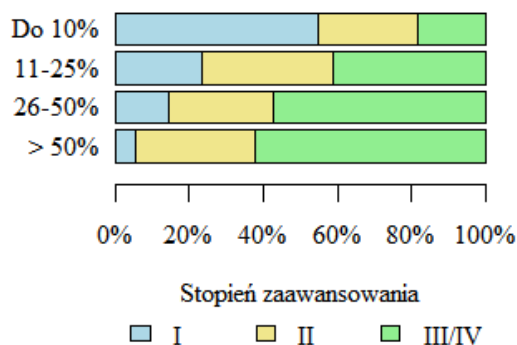
5.4 Obecność martwicy

Martwica w większości przypadków (ok. 74%) obejmowała ponad $\frac{1}{4}$ powierzchni wycinków, średnio ok. 42%. Jedynie w ok. 10% guzów była nieobecna lub niewielka jak przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Nasilenie martwicy w badanych guzach

Parametr		Łącznie (N=107)
Martwica [%]	śr $\pm$ SD	41,74 $\pm$ 24,09
	mediana	40
	kwartyle	20-60
Martwica	Do 10%	11 (10,28%)
	11-25%	17 (15,89%)
	26-50%	42 (39,25%)
	>50%	37 (34,58%)

Analiza statystyczna wykazała, że istnieje znamieny statystycznie związek pomiędzy stopniem zaawansowania patologicznego pT ($p<0,001$) i klinicznego ($p=0,017$) a rozległością martwicy: im większe nasilenie martwicy tym wyższy stopień pT i stopień zaawansowania klinicznego (rycina 1).



Rycina 1. Rozległość martwicy w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego

Nie wykazano związku pomiędzy nasileniem martwicy a typem histologicznym raka typem komponentu mięsakowatego, obecnością inwazji naczyń krwionośnych i limfatycznych, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych - pN, obecnością STAS ani ekspresją ZEB1.

W analizie OS i DFS przyjęto punkt odcięcia na poziomie 25%, podobnie jak w pracach innych autorów (9).

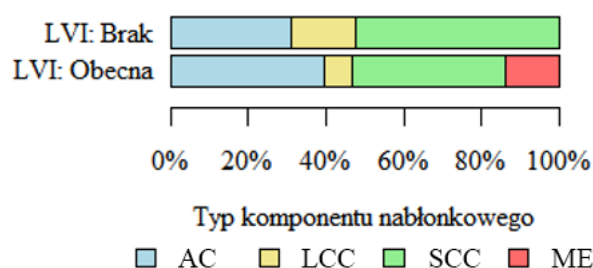
5.5 Inwazja naczyń limfatycznych i krwionośnych

W ok. 78,5% przypadków obserwowano zatory z komórek raka w świetle naczyń limfatycznych lub krwionośnych, przy czym inwazja naczyń krwionośnych była zjawiskiem częstszym (ok. 73%) niż inwazja naczyń limfatycznych (ok. 48%) (tabela 10).

Tabela 10. Inwazja naczyń limfatycznych (LVI) i krwionośnych (BVI)

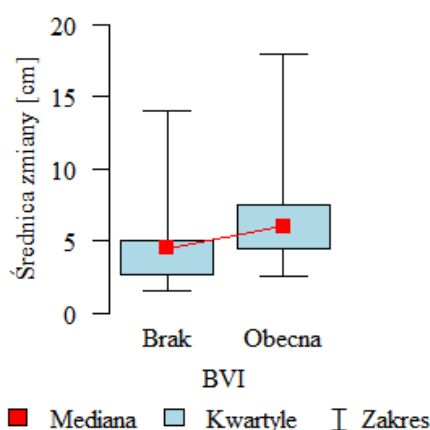
Parametr		Łącznie (N=107)
LVI	Brak	56 (52,34%)
	Obecna	51 (47,66%)
BVI	Brak	29 (27,10%)
	Obecna	78 (72,90%)
LVI/BVI	Brak LVI i BVI	23 (21,50%)
	Tylko LVI	6 (5,61%)
	Tylko BVI	33 (30,84%)
	LVI i BVI	45 (42,06%)
LVI lub BVI	Brak	23 (21,50%)
	Obecne	84 (78,50%)

Analiza statystyczna wykazała, że inwazja naczyń limfatycznych była znamienne częstsza ($p=0,028$) w guzach z mieszanym i złożonym komponentem raka, a rzadsza w przypadkach z utkaniem raka wielkokomórkowego. Występowanie LVI w poszczególnych typach histologicznych raka obrazuje rycina 2.

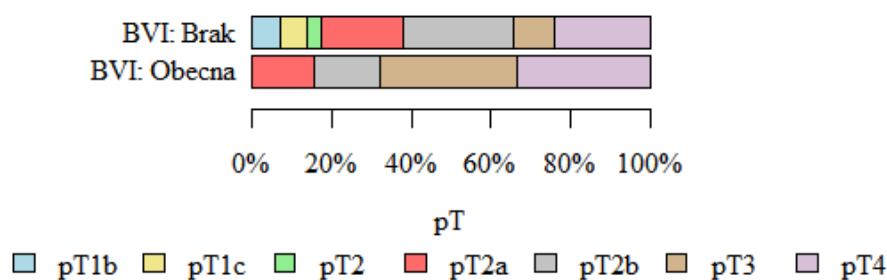


Rycina 2. Częstość inwazji naczyń limfatycznych w zależności od typu utkania nabłonkowego

W przypadku inwazji naczyń krwionośnych nie wykazano związku z typem histologicznym raka, natomiast w grupie z BVI wielkość guza (mierzona największym jego wymiarem) była istotnie większa ($p=0,001$), podobnie jak stopień pT ($p=0,002$) (rycina 3, rycina 4).



Rycina 3. Inwazja naczyń krwionośnych wobec średnicy guza



Rycina 4. Inwazja naczyń krwionośnych wobec stopnia zaawansowania pT

Nie wykazano związku pomiędzy obecnością inwazji naczyń limfatycznych i/lub krwionośnych a typem komponentu mięsakowatego, nasileniem martwicy, obecnością przerzutów do węzłów chłonnych pN, obecnością STAS ani ekspresją ZEB1.

5.6 Badania immunohistochemiczne

Wykonane badania immunohistochemiczne oceniano w kontekście utkania nabłonkowego i mięsakowatego. Dodatkowo analizowano nasilenie i rozległość reakcji. Uzyskane sumaryczne wyniki przedstawiono w tabeli 11 oraz tabeli 12.

Tabela 11. Ekspresja badanych markerów immunohistochemicznych w komponencie nabłonkowym i mięsakowatym

rodzaj markera \ ekspresja dodatnia	ani w E ani w S	tylko w E	tylko w S	w E i S
AE1/AE3	3 (2,80%)	14 (13,08%)	19 (17,76%)	71 (66,36%)
wimentyna	15 (14,02%)	0 (0,00%)	43 (40,19%)	49 (45,79%)
TTF1	52 (48,60%)	15 (14,02%)	17 (15,89%)	23 (21,50%)
p40	58 (54,21%)	18 (16,82%)	3 (2,80%)	28 (26,17%)
E-kadheryna	22 (20,56%)	40 (37,38%)	5 (4,67%)	40 (37,38%)
ZEB1	48 (44,86%)	0 (0,00%)	56 (52,34%)	3 (2,80%)

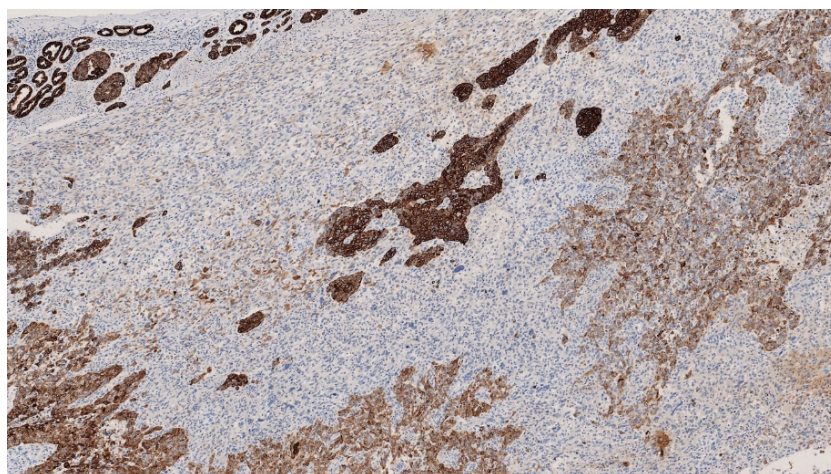
E - komponent nabłonkowy, S - komponent mięsakowaty

Tabela 12. Współczynnik ekspresji badanych markerów immunohistochemicznych w komponentcie nabłonkowym i mięsakowatym (stopień nasilenia reakcji x rozległość reakcji)

rodzaj markera	komponent nabłonkowy - E			komponent mięsakowaty - S		
	współczynnik ekspresji			współczynnik ekspresji		
	wysoki ≥8	niski <8	brak reakcji*	wysoki ≥8	niski <8	brak reakcji
AE1/AE3	83	2	0	75	15	17
wimentyna	24	25	36	90	2	15
TTF1	33	5	47	22	18	67
p40	39	7	39	22	9	76
E-kadheryna	72	8	5	31	14	62
Zeb1	1	2	82	39	20	48

*w 22 przypadkach w guzie nie stwierdzono komponentu nabłonkowego - E

Jedynie w 3 guzach, bez widocznego komponentu nabłonkowego, nie stwierdzono ekspresji cytokeratyny AE1/AE3 i E-kadheryny, a wyłącznie ekspresję wimentyny. W pozostałych przypadkach reakcja z przeciwciałem AE1/AE3 w komponentcie nabłonkowym była dodatnia i silnie nasilona, poza 2 guzami o słabym nasileniu reakcji. Odczyn na AE1/AE3 w komponentcie mięsakowatym był dodatni w 90 przypadkach (ok. 84%), ale w 17 guzach był słabo nasilony lub widoczny jedynie ogniskowo (ekspresja słaba, wskaźnik ekspresji < 8) (fot. 16, fot. 17).



*Fot. 16 Ekspresja AE1/AE3 w komponentcie nabłonkowym i mięsakowatym.
Barwienie IHC: AE1/AE3, pow. x50*



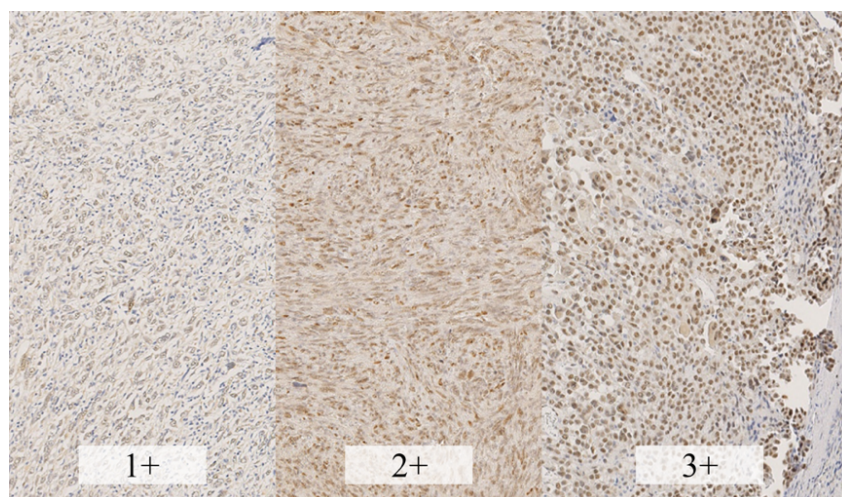
Fot. 17 Ekspresja wimentyny w komponencie nabłonkowym i mięsakowatym w tym samym guzie. Barwienie IHC: wimentyna, pow. x50

Reakcja na wimentynę była dodatnia w komponencie nabłonkowym w ok. 58% przypadków z obecnością tego komponentu, natomiast ujemna w komponencie mięsakowatym w 15 przypadkach, przy czym 12 z nich wykazywało różnicowanie płaskonabłonkowe z nasiloną, rozlaną ekspresją p40 i E-kadheryny w obu typach utkania, a 3 utkanie gruczołowe z nasiloną, rozlaną ekspresją TTF-1 i E-kadheryny w obu typach utkania.

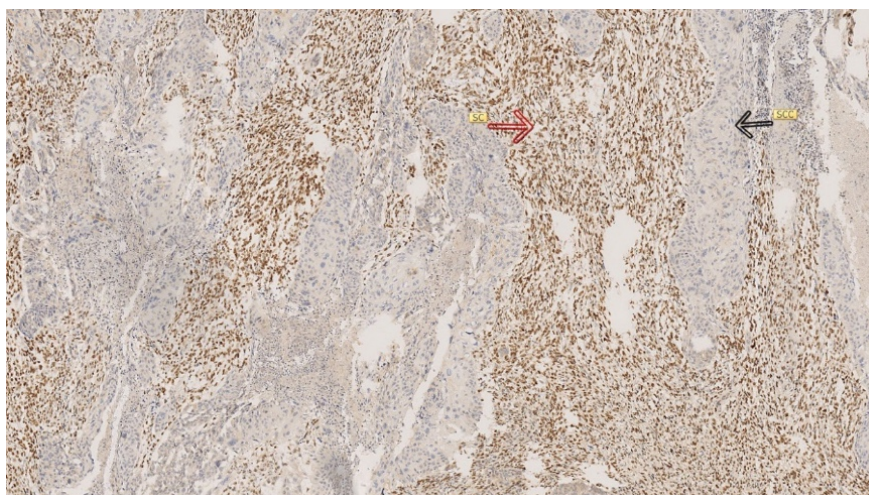
Ekspresję TTF1 i p40 stwierdzono zarówno w komponencie nabłonkowym, jak i mięsakowatym w zbliżonej liczbie przypadków, natomiast koekspresję obu markerów w tych samych komórkach obserwowano jedynie w 2 przypadkach w utkaniu nabłonkowym oraz 2 w utkaniu mięsakowatym.

Ekspresja E-kadheryny w komponencie nabłonkowym była zbliżona do ekspresji AE1/AE3, jednak wyraźnie słabsza i rzadsza w komponencie mięsakowatym.

Dodatnią reakcję z przeciwciałem ZEB1 w utkaniu mięsakowatym obserwowano w ok. 55% guzów, a w komórkach zróżnicowanego raka jedynie w 3 przypadkach. Koekspresję ZEB1 i E-kadheryny w tych samych komórkach stwierdzono w 3 przypadkach, w 2 przypadkach w komponencie mięsakowatym i w 2 w nabłonkowym, przy czym obie reakcje były słabo nasilone. Fot. 18 oraz fot. 19 przedstawiają dodatnią ekspresję ZEB1.



Fot. 18 Nasilenie ekspresji ZEB1. Barwienie IHC: ZEB1, pow. x100



*Fot. 19 Dodatnia ekspresja ZEB1 w komponencie wrzecionowatokomórkowym (strzałka czerwona) i ujemna w komponencie płaskonabłonkowym (strzałka czarna).
Barwienie IHC: ZEB1, pow. x50*

Dodatnią ekspresję badanych markerów immunohistochemicznych w poszczególnych typach utkania histologicznego przedstawia tabela 13.

Tabela 13. Dodatnia ekspresja badanych markerów immunohistochemicznych w poszczególnych typach utkania histologicznego

	AC n=30	SCC n=39	LCC n=10	ME n=6	gc n=17	sc n=30	ms n=60
AE1/AE3	30 (100%)	39 (100%)	10 (100%)	6 (100%)	15 (88,24%)	23 (76,67%)	52 (86,67%)
wimentyna	17 56,67%	20 (51,28%)	7 (70,00%)	5 (83,33%)	14 (82,35%)	25 (83,33)	53 (88,33%)
TTF1	28 (93,33%)	7 (17,95%)	0 (0,00%)	4 (66,67%)	7 (41,18%)	8 (26,67%)	25 (41,67%)
p40	2 (6,67%)	38 (97,44%)	1 (10,00%)	5 (83,33%)	4 (23,53%)	12 (40,00%)	16 (26,67%)
E-kadheryna	29 (96,67%)	39 (100%)	6 (60,00%)	6 (100%)	8 (47,06%)	13 (43,33%)	24 (40,00%)
ZEB1	0 (0,00%)	2 (5,13%)	1 (10,00%)	0 (0,00%)	12 (70,59%)	14 (46,67%)	33 (55,00%)

AC - rak gruczolowy (ang. *adenocarcinoma*), LCC - rak wielkomórkowy (ang. *large cell carcinoma*), SCC - rak płaskonabłonkowy (ang. *squamous cell carcinoma*), ME - utkanie nabłonkowe mieszane: ACC i SCC lub rak gruczolowo-płaskonabłonkowy, gc - utkanie olbrzymiomórkowe (ang. *giant cell*), sc - utkanie wrzecionowatomórkowe (ang. *spindle cell*), ms - utkanie mięsakiowate mieszane gc i sc

Ze względu na ekspresję AE1/AE3 i wimentyny w utkaniu nabłonkowym i mięsakiowatym, podzielono wszystkie przypadki na cztery grupy immunohistochemiczne - co prezentuje tabela 14 - oraz poddano analizie statystycznej. Nie stwierdzono znamiennej statystycznie zależności ($p > 0,05$) z: wielkością zmiany, stopniem zaawansowania, obecnością lub brakiem inwazji naczyń krwionośnych i limfatycznych, ekspresją PD-L1 i obecnością STAS. Stwierdzono natomiast istotny związek ekspresji ZEB1 z profilem ekspresji AE1/AE3 i wimentyny ($p < 0,001$); ZEB1 najczęściej był dodatni w grupie 1, nieco rzadziej w 3 i 2, a najrzadziej w 4, w której nie obserwowano ekspresji wimentyny. Podział, liczebność grup i ekspresję ZEB1 przedstawia tabela 14.

Tabela 14. Podział, liczebność i ekspresja ZEB1 w wydzielonych grupach immunohistochemicznych

IHC	AE1/AE3	wimentyna	n	%	ZEB1(-)	ZEB1(+)
Grupa 1	E+,	E(-), S(+)	21	19,63%	6 (28,57%)	15 (71,43%)
Grupa 2	E+	E(+), S(+)	49	45,79%	20 (40,82%)	29 (59,18%)
Grupa 3	Brak komponentu E	S(+)	22	20,56%	7 (31,82%)	15 (68,18%)
Grupa 4	E(+)	E(-), S(-)	15	14,02%	15 (100,00%)	0 (0,00%)

E - komponent nabłonkowy, S - komponent mięsakowaty

Ekspresja ZEB1 i E-kadheryny w komponentcie mięsakowatym nie miały statystycznie znamiennej związku ze stopniem zaawansowania, rozległością martwicy, inwazją naczyń limfatycznych i krwionośnych, inwazją opłucnej, ekspresją PD-L1 oraz obecnością lub brakiem STAS ($p>0,05$). Nie wykazano również związku silnej ekspresji ZEB1 (wskaźnik ≥ 8) z wymienionymi powyżej parametrami. W guzach z dodatnią ekspresją ZEB1 rzadziej obserwowano przerzuty do węzłów chłonnych ($p=0,033$) w stosunku do grupy z ujemną reakcją, ale nie miało to związku z nasileniem reakcji.

5.7 Ekspresja PD-L1

Dodatni odczyn z PD-L1 obserwowano w 68 przypadkach (ok. 64%), przy czym w większości guzów (ok. 62%) odczyn był silny, dotyczył 50% i więcej komórek raka ($TPS\geq 50\%$). Nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji PD-L1 w komponentcie nabłonkowym i mięsakowatym (tabela 15).

Tabela 15. Ekspresja PD-L1 w całym guzie i w poszczególnych komponentach

Parametr		Łącznie (N=107)
PD-L1	Odczyn ujemny (TPS<1%)	39 (36,45%)
	Odczyn dodatni (TPS≥1%)	68 (63,55%)
	Odczyn słaby (TPS 1-49%)	23 (21,50%)
	Odczyn silny (TPS≥50%)	45 (42,06%)
PD-L1 w wybranych przedziałach	0	39 (36,45%)
	≥1%	9 (8,41%)
	≥5%	1 (0,93%)
	≥10%	13 (12,15%)
	≥50%	45 (42,06%)
PD-L1 E w komponentie nabłonkowym	Odczyn ujemny (TPS<1%)	41 (38,32%)
	Odczyn dodatni (TPS≥1%)	44 (41,12%)
	Odczyn słaby (TPS 1-49%)	19 (17,76%)
	Odczyn silny (TPS≥50%)	25 (23,36%)
	Brak komponentu	22 (20,56%)
PD-L1 E w wybranych przedziałach	0	41 (38,32%)
	≥1%	5 (4,67%)
	≥5%	4 (3,74%)
	≥10%	10 (9,35%)
	≥50%	25 (23,36%)
	Brak komponentu	22 (20,56%)
PD-L1 S	Odczyn ujemny (TPS<1%)	44 (41,12%)
	Odczyn dodatni (TPS≥1%)	63 (58,88%)
	Odczyn słaby (TPS 1-49%)	19 (17,76%)
	Odczyn silny (TPS≥50%)	44 (41,12%)
PD-L1 S w wybranych przedziałach	0	44 (41,12%)
	≥1%	7 (6,54%)
	≥5%	3 (2,80%)
	≥10%	9 (8,41%)
	≥50%	44 (41,12%)

PD-L1 E - w komponentie nabłonkowym, PD-L1 S - w komponentie mięsakowatym, TPS - Tumor Proportion Score

Zaobserwowano różnicę w ekspresji PD-L1 w zależności od wieku blozków parafinowych. Im starszy materiał, tym rzadziej stwierdzano dodatnią reakcję (tabela 16), ale różnica ta nie była znamienna statystycznie ($p=0,056$). Powtórzono reakcje ujemne u pacjentów z okresu 2000-2004, co nie wpłynęło na zmianę wyników.

Tabela 16. Ekspresja PD-L1 u pacjentów operowanych w okresach 2000-2004, 2005-2009, 2010-2014, 2015-2019

Ekspresja PD-L1	Rok operacji				p
	2000-2004 (N=26)	2005-2009 (N=21)	2010-2014 (N=33)	2015-2019 (N=27)	
Ujemna	15 (57,69%)	8 (38,10%)	9 (27,27%)	7 (25,93%)	$p=0,056$
Dodatnia	11 (42,31%)	13 (61,90%)	24 (72,73%)	20 (74,07%)	

p - test chi-kwadrat

Najczęściej dodatnią i silną ekspresję PD-L1 stwierdzano w guzach z utkaniem raka wielkokomórkowego, zarówno w komponencie nabłonkowym i w towarzyszącym mu utkaniu mięsakowatym, a najrzadziej w guzach z mieszanym utkaniem nabłonkowym (gruczołowym i płaskonabłonkowym). Różnica ta była znamienna statystycznie ($p<0,001$). Dodatni odczyn obserwowano znamienne częściej w utkaniu raka gruczołowego niż płaskonabłonkowego ($p=0,012$) (tabela 17, tabela 18).

Tabela 17. Częstość dodatniej ekspresji PD-L1 w zależności od typu komponentu nabłonkowego.

Parametr		Typ histologiczny raka				p
		AC (N=30)	LCC (N=10)	SCC (N=39)	ME (N=6)	
PD-L1	Odczyn ujemny TPS<1	7 (23,33%)	0 (0,00%)	22 (56,41%)	4 (66,67%)	p<0,001*
	Odczyn dodatni TPS≥1	23 (76,67%)	10 (100,00%)	17 (43,59%)	2 (33,33%)	
PD-L1 E	Odczyn ujemny TPS<1	12 (40,00%)	2 (20,00%)	23 (58,97%)	4 (66,67%)	p=0,089
	Odczyn dodatni TPS≥1	18 (60,00%)	8 (80,00%)	16 (41,03%)	2 (33,33%)	
PD-L1 S	Odczyn ujemny TPS<1	10 (33,33%)	0 (0,00%)	23 (58,97%)	4 (66,67%)	p=0,001*
	Odczyn dodatni TPS≥1	20 (66,67%)	10 (100,00%)	16 (41,03%)	2 (33,33%)	

p - dla zmiennych ilościowych test Kruskala-Wallisa, dla zmiennych jakościowych test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera; różnica istotna statystycznie (p<0,05)

Tabela 18. Nasilenie ekspresji PD-L1 w zależności od typu histologicznego komponentu nabłonkowego

Parametr		Typ histologiczny raka				p
		AC (N=30)	LCC (N=10)	SCC (N=39)	ME (N=6)	
PD-L1	Odczyn ujemny (TPS<1%)	7 (23,33%)	0 (0,00%)	22 (56,41%)	4 (66,67%)	p<0,001*
	Odczyn słaby (TPS 1-49%)	8 (26,67%)	0 (0,00%)	7 (17,95%)	2 (33,33%)	
	Odczyn silny (TPS≥50%)	15 (50,00%)	10 (100,00%)	10 (25,64%)	0 (0,00%)	
PD-L1 E	Odczyn ujemny (TPS<1%)	12 (40,00%)	2 (20,00%)	23 (58,97%)	4 (66,67%)	p=0,029*
	Odczyn słaby (TPS 1-49%)	10 (33,33%)	1 (10,00%)	6 (15,38%)	2 (33,33%)	
	Odczyn silny (TPS≥50%)	8 (26,67%)	7 (70,00%)	10 (25,64%)	0 (0,00%)	
PD-L1 S	Odczyn ujemny (TPS< 1%)	10 (33,33%)	0 (0,00%)	23 (58,97%)	4 (66,67%)	p=0,001*
	Odczyn słaby (TPS 1-49%)	4 (13,33%)	2 (20,00%)	6 (15,38%)	2 (33,33%)	
	Odczyn silny (TPS≥50%)	16 (53,33%)	8 (80,00%)	10 (25,64%)	0 (0,00%)	

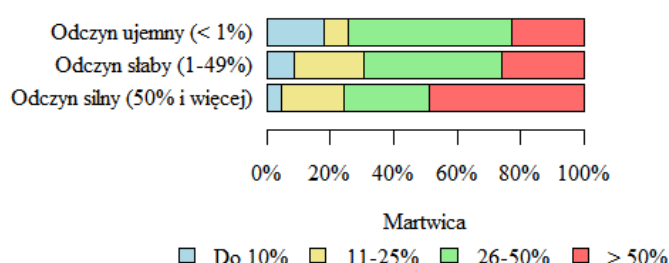
p - dla zmiennych ilościowych test Kruskala-Wallisa, dla zmiennych jakościowych test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera; różnica istotna statystycznie (p<0,05)

Analiza statystyczna pacjentów operowanych w okresie 2010-2019 (60 chorych) wykazała podobne zależności, ale nie były one istotne statystycznie, prawdopodobnie ze względu na mniejszą liczbę pacjentów.

Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w nasileniu i częstości ekspresji PD-L1 w zależności od typu tkanienia mięsakowego. W badaniu pacjentów z okresu 2010-2019 także nie wykazano takiej zależności.

Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała statystycznie istotnego związku ($p > 0,05$) pomiędzy częstością i nasileniem ekspresji PD-L1 a obecnością inwazji naczyń limfatycznych lub krwionośnych, inwazją opłucnej, cechą pN i pT, obecnością STAS oraz ekspresją ZEB1.

Dodatni odczyn PD-L1 był istotnie częściej silnie nasilony w guzach z rozległą martwicą $\geq 50\%$ ($p = 0,023$) (rycina 5).



Rycina 5. Rozległość martwicy a nasilenie ekspresji PD-L1

Dodatnia ekspresja PD-L1 była tym silniejsza w komórkach raka im naciek zapalny w obrębie guza był intensywniejszy ($p < 0,001$), ale nie miała związku z nasileniem włóknienia w obrębie guza (tabela 19).

Tabela 19. Zależność ekspresji PD-L1 w komórkach raka od nacieku zapalnego i włóknienia podścieliska

Parametr		PDL			p
		Odczyn ujemny (<1%) (N=39)	Odczyn słaby (1-49%) (N=23)	Odczyn silny (≥50%) (N=45)	
Naciek zapalny	Skąpy	14 (35,90%)	0 (0,00%)	2 (4,44%)	p<0,001*
	Słabo nasilony	8 (20,51%)	3 (13,04%)	11 (24,44%)	
	Średnio nasilony	12 (30,77%)	12 (52,17%)	12 (26,67%)	
	Intensywny	5 (12,82%)	8 (34,78%)	20 (44,44%)	
Włóknienie	Brak lub niewielkie	23 (58,97%)	10 (43,48%)	20 (44,44%)	p=0,312
	Średnio nasilone	5 (12,82%)	8 (34,78%)	12 (26,67%)	
	Intensywne	11 (28,21%)	5 (21,74%)	13 (28,89%)	

p - dla zmiennych ilościowych test Kruskala-Wallisa, dla zmiennych jakościowych test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera; różnica istotna statystycznie (p<0,05)

W grupie chorych z okresu 2010-2019 wykazano podobne zależności, ale nie były one znamienne statystycznie.

5.8 STAS

Zjawisko STAS oceniano w grupie 99 chorych. Obecność cech szerzenia się przestrzeniami powietrznymi stwierdzono u 39 pacjentów – ok. 39% (18 kobiet i 21 mężczyzn). W 18 przypadkach zmiany uznano za artefakty i nie uwzględniono w dalszej analizie. U 33 chorych granica pomiędzy guzem a otaczającym mięszem płuca była nieregularna, a w 6 przypadkach brzeg guza był równy.

STAS występował nieco częściej w gruczolakorakach i rakach mieszanych niż w raku płaskonabłonkowym, ale nie były to różnice istotne statystycznie (p=0,643) (tabela 20).

Tabela 20. Występowanie STAS a typ histologiczny komponentu nabłonkowego

Parametr		Typ histologiczny komponentu nabłonkowego				p
		AC (N=30)	LCC (N=8)	SCC (N=35)	ME (N=5)	
STAS	STAS-	15 (50,00%)	5 (62,50%)	23 (65,71%)	3 (60,00%)	p=0,643
	STAS+	15 (50,00%)	3 (37,50%)	12 (34,29%)	2 (40,00%)	

p - dla zmiennych ilościowych test Kruskala-Wallisa, dla zmiennych jakościowych test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera

Nie stwierdzono również istotnych różnic w częstości występowania STAS w zależności od typu utkania mięsakovatego (p=0,138), pomimo że najrzadziej zjawisko to pojawiało się przy utkaniu wrzecionowatokomórkowym (tabela 21).

Tabela 21. Występowanie STAS a typ histologiczny komponentu mięsakovatego

Parametr		Typ histologiczny komponentu mięsakovatego			p
		gc (N=17)	sc (N=26)	ms (N=56)	
STAS	STAS-	9 (52,94%)	20 (76,92%)	31 (55,36%)	p=0,138
	STAS+	8 (47,06%)	6 (23,08%)	25 (44,64%)	

p - dla zmiennych ilościowych test Kruskala-Wallisa, dla zmiennych jakościowych test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera

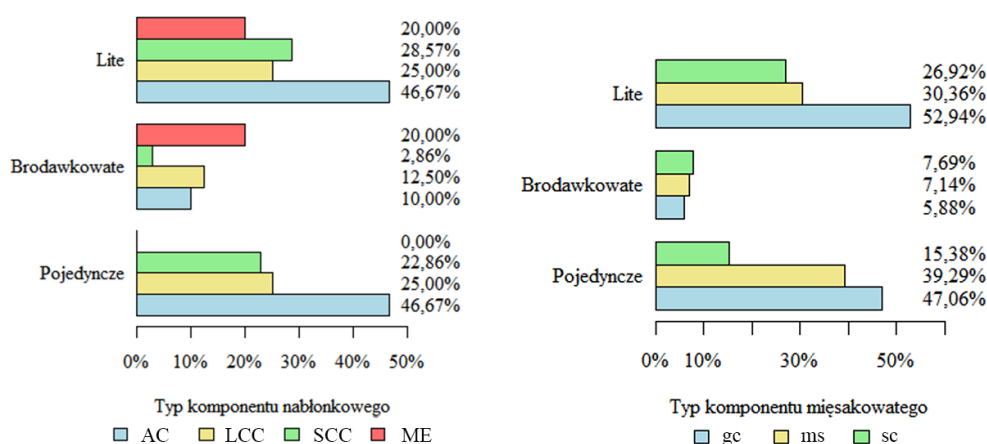
Drobnobrodawkowate grupy, lite gniazda lub pojedyncze komórki występowały w różnej odległości od brzegu nacieku, a w obrębie jednego guza obserwowano różne typy zmian, co przedstawiono w tabeli 22.

Tabela 22. Typy morfologiczne STAS

Typ STAS	n	%
Pojedyncze komórki	34	34,34%
Struktury brodawkowate	7	7,07%
Lite gniazda	33	33,33%

Nie wykazano istotnego związku pomiędzy typem histologicznym komponentu nabłonkowego i mięsakovatego a typem morfologicznym STAS (p>0,005). Częstość typów

morfologicznych STAS w poszczególnych utkaniach histologicznych komponentu nabłonkowego i mięsakowatego prezentuje rycina 6.



Rycina 6. Częstość typów morfologicznych STAS w poszczególnych utkaniach histologicznych komponentu nabłonkowego i mięsakowatego

W oparciu o algorytm podany przez Uruga i wsp. (59) w 17 przypadkach (43,6%) stwierdzono STAS o dużym nasileniu - hs, a w 22 przypadkach (56,4%) o małym nasileniu - ls. Liczebność grup była zbyt mała do miarodajnej analizy statystycznej pod kątem innych parametrów.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że STAS występował znamiennej częściej u chorych z wyższym stopniem zaawansowania choroby ($p=0,023$), ale nie stwierdzono istotnego związku ($p>0,05$) z wielkością zmiany, obecnością inwazji naczyń krwionośnych lub limfatycznych, rozległością martwicy, a także ekspresją ZEB1 i E-kadheryny.

5.9 Przeżycie całkowite (OS)

Dane dotyczące przeżycia całkowitego (OS) były dostępne u wszystkich chorych, w tym 36 chorych żyło w momencie zakończenia badania tj. dnia 30.06.2020. Czas obserwacji tych chorych wynosił średnio 7,43 lata ($SD=4,77$) i wahał się od 0,56 do 16,95 lat (tabela 23).

Tabela 23. Czas obserwacji chorych w dniu zakończenia badania

Czas obserwacji [lata]								
N	Braki danych	Średnia	SD	Mediana	Min	Max	Q1	Q3
36	0	7,43	4,77	7,09	0,56	16,95	3	10,31

Mediana OS w badanej grupie wyniosła 1,92 lata, a przeżycie całkowite w horyzoncie 1 roku, 3 lat i 5 lat przedstawiono w tabeli 24. Nie zaobserwowano istotnych różnic w przeżyciu całkowitym dla kobiet i mężczyzn ($p=0,805$).

Tabela 24. Przeżycia całkowite w badanej grupie

Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]			
		1	3	5	Mediana
107	71	67,99%	46,22%	41,62%	1,92

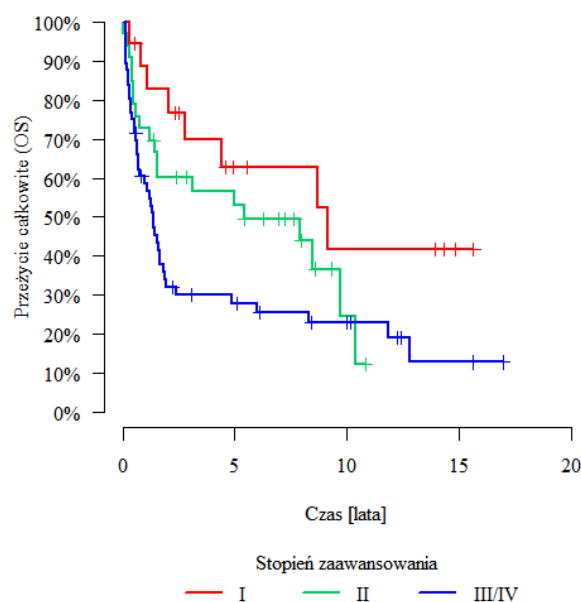
5.9.1 Przeżycie całkowite a stopień zaawansowania

Przeżycia całkowite dla poszczególnych stopni zaawansowania różniły się istotnie (tabela 25, rycina 7). Najmniej korzystne rokowania stwierdzono w grupie III/IV, a najlepsze w grupie I.

Tabela 25. Przeżycie całkowite wobec stopni zaawansowania

Stopień zaawansowania	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
I	18	8	88,54%	69,76%	62,78%	9,11	p=0,014*
II	33	20	72,73%	60,19%	53,11%	5,43	
III/IV	56	43	58,55%	30,10%	27,95%	1,38	

p - test LR (log-rank)



Rycina 7. Skumulowane prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec stopni zaawansowania

5.9.2 Przeżycie całkowite a obecność martwicy

Mediana przeżycia całkowitego dla guzów z niewielką martwicą, tzn. do 25% powierzchni, wyniosła 8,3 lat, a dla guzów z martwicą > 25% - 1,55 lata, ale nie była to różnica znamienne statystycznie ($p=0,087$) (tabela 26).

Tabela 26. Przeżycie całkowite wobec nasilenia martwicy

Martwica	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Do 25%	28	16	85,71%	62,61%	57,79%	8,3	$p=0,087$
> 25%	79	55	61,60%	40,63%	35,94%	1,55	

p - test LR (log-rank)

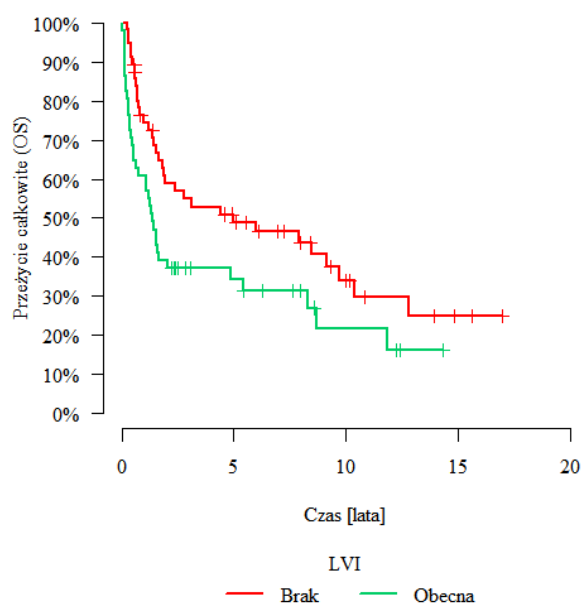
5.9.3 Przeżycie całkowite a inwazja naczyń limfatycznych i krwionośnych

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w czasie przeżycia całkowitego pomiędzy chorymi z inwazją naczyń limfatycznych i bez inwazji ($p=0,028$) (tabela 27, rycina 8) oraz pomiędzy chorymi z inwazją naczyń krwionośnych i bez inwazji ($p=0,048$) (tabela 28, rycina 9). Gorsze rokowanie wykazano w grupach z inwazją którychkolwiek naczyń.

Tabela 27. Przeżycie całkowite wobec braku lub obecności inwazji naczyń limfatycznych

LVI	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Brak	56	34	74,39%	54,85%	48,81%	4,96	p=0,028*
Obecna	51	37	60,78%	37,25%	34,39%	1,39	

p - test LR (log-rank)

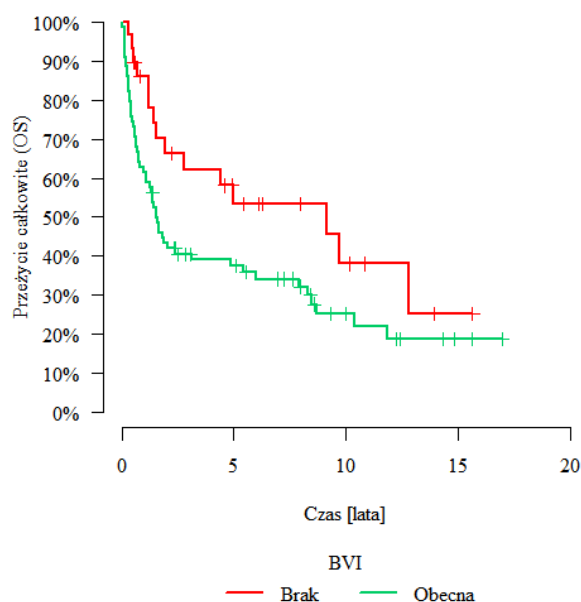


Rycina 8. Skumulowane prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec inwazji naczyń limfatycznych

Tabela 28. Przeżycie całkowite wobec braku lub obecności inwazji naczyń krwionośnych

BVI	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Brak	29	15	85,92%	62,24%	53,25%	9,11	p=0,048*
Obecna	78	56	61,54%	40,58%	37,46%	1,55	

p - test LR (log-rank)



Rycina 9. Skumulowane prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec inwazji naczyń krwionośnych

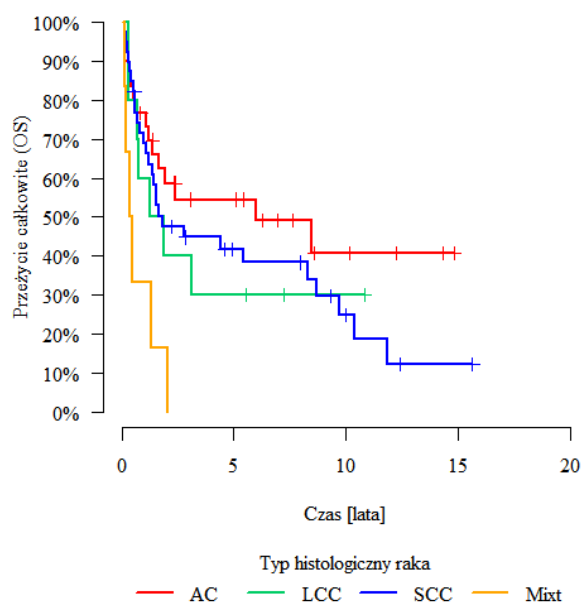
5.9.4 Przeżycie całkowite a typ histologiczny komponentu nabłonkowego

Mediana przeżycia całkowitego była najwyższa w grupie z komponentem raka gruczołowego i wynosiła 6 lat. Analiza krzywych przeżycia w zależności od typu histologicznego raka wykazała, że najgorsze rokowanie dotyczyło pacjentów z utkaniem mieszanym gruczołowym i płaskonabłonkowym oraz z utkaniem raka gruczołowo-płaskonabłonkowego (tabela 29, rycina 10).

Tabela 29. Przeżycie całkowite wobec typu histologicznego komponentu nabłonkowego

Typ komponentu nabłonkowego	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
AC	30	15	76,67%	54,50%	54,50%	6	p=0,006
LCC	10	7	60,00%	40,00%	30,00%	1,27	
SCC	39	28	68,82%	44,84%	41,85%	1,83	
ME	6	6	33,33%	>max obs.	>max obs.	0,34	

p - test LR (log-rank); max obs. - przekracza maksymalną długość obserwacji w tej grupie



Rycina 10. Skumulowane prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec typu histologicznego komponentu nabłonkowego

5.9.5 Przeżycie całkowite a typ histologiczny komponentu mięsakovatego

Mediana całkowitego przeżycia w grupie guzów z utkaniem olbrzymiokomórkowym była najniższa (0,52 lata), ale różnice w OS nie były istotne statystycznie (tabela 30).

Tabela 30. Przeżycie całkowite wobec typu histologicznego komponentu mięsakovatego

Typ komponentu mięsakovatego	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
gc	17	12	47,06%	33,61%	25,21%	0,52	p=0,216
sc	30	21	80,00%	48,89%	41,03%	2,03	
ms	60	38	68,07%	48,55%	46,53%	2,79	

p - test LR (log-rank)

Rozległość komponentu mięsakovatego nie miała wpływu na OS (p=0,201, HR 0,995; 95%CI 0,988-1,003).

5.9.6 Przeżycie całkowite a ekspresja markerów immunohistochemicznych transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej

Nie wykazano znamiennych statystycznie różnic w przeżyciu całkowitym w zależności od ekspresji wimentyny i cytokeratyny AE1/AE3 w wyodrębnionych grupach ($p=0,87$), co zaprezentowano w tabeli 31.

Tabela 31. Przeżycia całkowite dla grup wyodrębnionych w oparciu o ekspresję AE1/AE3 i wimentyny

Grupa IHC*	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Grupa 1 E(-), S(+)	21	13	80,95%	52,38%	47,62%	4,4	p=0,87
Grupa 2 E(+), S(+)	49	33	57,14%	41,96%	39,49%	1,92	
Grupa 3 Brak E	22	15	67,61%	53,12%	42,50%	4,84	
Grupa 4 E(-), S(-)	15	10	86,67%	39,39%	39,39%	1,67	

*ekspresja wimentyny w komponentcie nabłonkowym E i mięsakowatym S; p - test LR (log-rank)

Nie wykazano także istotnych różnic w przeżyciu całkowitym w zależności od ekspresji E-kadheryny w komponentcie mięsakowatym (tabela 32) oraz od ekspresji ZEB1 w komponentcie mięsakowatym (tabela 33). Nie stwierdzono również istotnych różnic w OS w zależności od nasilenia ekspresji ZEB1.

Tabela 32. Przeżycie całkowite wobec ekspresji E-kadheryny w komponentcie mięsakowatym

Odczyn z E-kadheryną	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Ujemny	62	43	64,52%	44,67%	37,43%	1,63	p=0,484
Dodatni	45	28	72,99%	48,40%	48,40%	2,41	

p - test LR (log-rank)

Tabela 33. Przeżycie całkowite wobec ekspresji ZEB1 w komponencie mięsakowatym

Odczyn z ZEB1	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Ujemny	48	33	72,30%	42,70%	42,70%	1,83	p=0,822
Dodatni	59	38	64,41%	48,85%	40,94%	2,03	

p - test LR (log-rank)

W zależności od stwierdzonej w komponencie mięsakowatym ekspresji E-kadheryny oraz ZEB1, podzielono badaną grupę na cztery podgrupy: ZEB1+/E-kadheryna-, ZEB1+/E-kadheryna+, ZEB1-/E-kadheryna+, ZEB1-/E-kadheryna-; nie stwierdzając istotnych różnic w medianie OS oraz w krzywych przeżycia całkowitego.

5.9.7 Przeżycie całkowite a ekspresja PD-L1

Nie stwierdzono istotnych różnic w przeżyciu całkowitym u chorych z dodatnią ekspresją i brakiem ekspresji PD-L1 (p=0,458) oraz w zależności od nasilenia reakcji dodatniej (tabela 34).

Tabela 34. Przeżycie całkowite wobec ekspresji PD-L1 i jej nasilenia

PD-L1	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Odczyn ujemny (<1%)	39	29	69,23%	41,03%	37,87%	1,54	p=0,755
Odczyn słaby (1-49%)	23	15	73,91%	53,75%	48,38%	4,84	
Odczyn silny (≥50%)	45	27	64,05%	47,46%	41,53%	1,92	

p - test LR (log-rank)

Badano także zależność przeżycia całkowitego od ekspresji PD-L1 w połączeniu z ekspresją ZEB1, inwazją naczyń krwionośnych lub limfatycznych oraz rozległością martwicy. W analizie dwuczynnikowej nie wykazano, w żadnym przypadku istotnych statystycznie różnic (p>0,05).

5.9.8 Przeżycie całkowite a STAS

Mediana przeżycia całkowitego dla grupy chorych z cechami szerzenia się raka drogami powietrznymi STAS(+) wyniosła 1,43 lat, a dla grupy STAS(-) 3,12 lat, ale nie była to różnica znamionna statystycznie ($p=0,052$) (tabela 35).

Tabela 35. Przeżycie całkowite wobec obecności cech szerzenia się drogami powietrznymi STAS

STAS	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
STAS(-)	60	35	71,14%	51,08%	49,11%	3,12	$p=0,052$
STAS(+)	39	28	58,97%	37,87%	34,43%	1,43	

p - test LR (log-rank)

Nie zaobserwowano różnicy w przeżyciu całkowitym pomiędzy grupą z dużą liczbą komórek i grup w drogach oddechowych (hs) i małą (ls) wg kryteriów zaproponowanych przez Uruga i wsp. ($p=0,161$) (tabela 36).

Tabela 36. Przeżycie całkowite u chorych z wysokim (hs) i niskim (ls) STAS

STAS	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie całkowite [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
STAS(-)	68	43	73,12%	50,89%	45,67%	3,12	$p=0,161$
ls	22	15	63,64%	45,45%	37,88%	1,43	
hs	17	13	52,94%	29,41%	29,41%	1,19	

p - test LR (log-rank)

5.9.9 Analiza wieloczynnikowa predyktorów czasu przeżycia całkowitego

Analiza wpływu zmiennych ilościowych na czas przeżycia całkowitego wykonana za pomocą modelu hazardów proporcjonalnych Coxa wykazała, że istotnymi ($p<0,05$) niezależnymi predyktorami przeżycia całkowitego były:

- stopień zaawansowania III/IV: $HR=2,844$, a więc podnosi on prawdopodobieństwo zgonu w każdym czasie 2,844 razy w stosunku do stopnia I;

- typ komponentu nabłonkowego mieszany (utkanie gruczołowe i płaskonabłonkowe): HR=7,249, a więc podnosi on prawdopodobieństwo zgonu w każdym czasie 7,249 razy w stosunku do gruczolakoraka.

Analizę prezentuje tabela 37, wyniki przedstawiono w postaci wartości parametrów HR z 95-procentowym przedziałem ufności.

Tabela 37. Analiza wpływu zmiennych ilościowych na czasy przeżycia całkowitego - OS

Cecha		HR	95%CI		p
Stopień zaawansowania	I	1	ref.		
	II	1,76	0,636	4,87	0,276
	III/IV	2,844	1,068	7,574	0,037 *
Martwica	Do 25%	1	ref.		
	> 25%	0,705	0,338	1,467	0,35
LVI	Brak	1	ref.		
	Obecna	1,285	0,699	2,363	0,419
BVI	Brak	1	ref.		
	Obecna	1,494	0,736	3,032	0,266
Grupa IHC w zależności od ekspresji wimentyny w komponente E i S	Grupa 1	1	ref.		
	Grupa 2	1,051	0,459	2,407	0,907
	Grupa 3	1,268	0,466	3,454	0,642
	Grupa 4	1,669	0,549	5,079	0,367
Typ komponentu nabłonkowego	AC	1	ref.		
	LCC	3,155	0,957	10,394	0,059
	SCC	1,77	0,797	3,929	0,161
	ME	7,249	1,986	26,458	0,003 *
Typ komponentu mięsakowatego	gc	1	ref.		
	sc	0,368	0,132	1,027	0,056
	ms	0,534	0,244	1,167	0,116
E-cad S	Ujemny	1	ref.		
	Dodatni	0,576	0,259	1,284	0,178
ZEB1 S	Ujemny	1	ref.		

Cecha		HR	95%CI		p
	Dodatni	0,749	0,326	1,722	0,496
PD-L1	PD-L1(-)	1	ref.		
	PD-L1(+)	0,796	0,418	1,515	0,487
STAS	STAS(-)	1	ref.		
	STAS(+)	1,541	0,846	2,809	0,158

*zależność istotna statystycznie ($p < 0,05$); p - wieloczynnikowy model hazardów proporcjonalnych Coxa

5.10 Przeżycie wolne od choroby (DFS)

Do analizy włączono 70 chorych, u których były dostępne dane na temat przebiegu pooperacyjnego. 24 pacjentów z tej grupy żyło w momencie zakończenia obserwacji tj. 30.06.2020r. Ich średni czas obserwacji w tej grupie wynosił średnio 7,77 lata (SD=4,99) i wahał się od 0,56 do 15,64 lat (tabela 38).

Tabela 38. Czas obserwacji chorych ze znaną historią pooperacyjną w dniu zakończenia badania

Czas obserwacji [lata]								
N	Braki danych	Średnia	SD	Mediana	Min	Max	Q1	Q3
24	0	7,77	4,99	7,43	0,56	15,64	4,13	12,29

Mediana DFS wynosiła 1,54 lat, przeżycie wolne od choroby w horyzoncie 1 roku, 3 lat i 5 lat prezentuje tabela 39.

Tabela 39. Przeżycie wolne od choroby w badanej grupie

Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]			
		1	3	5	Mediana
70	51	63,90%	44,12%	35,75%	1,54

Nie zaobserwowano różnic w DFS dla kobiet i mężczyzn ($p=0,934$).

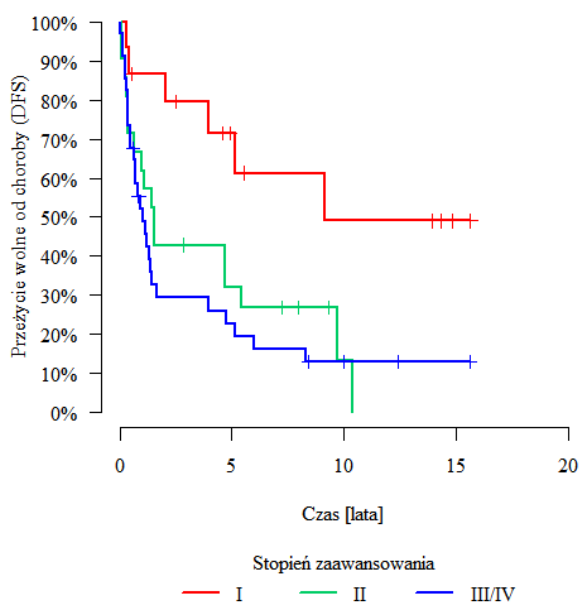
5.10.1 Przeżycie wolne od choroby a stopień zaawansowania

Przeżycia wolne od choroby dla poszczególnych grup zaawansowania różniły się istotnie (tabela 40, rycina 11). Mediana DFS była najniższa w grupie III/IV, a najwyższa w grupie I.

Tabela 40. Przeżycie wolne od choroby wobec stopnia zaawansowania

Stopień zaawansowania	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
I	15	6	86,67%	79,44%	71,50%	9,11	p=0,011
II	21	17	66,67%	42,86%	32,14%	1,54	
III/IV	34	28	52,09%	29,30%	22,79%	1,02	

p - test LR (log-rank)



Rycina 11. Krzywe przeżycia czasu wolnego od choroby oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec stopnia zaawansowania

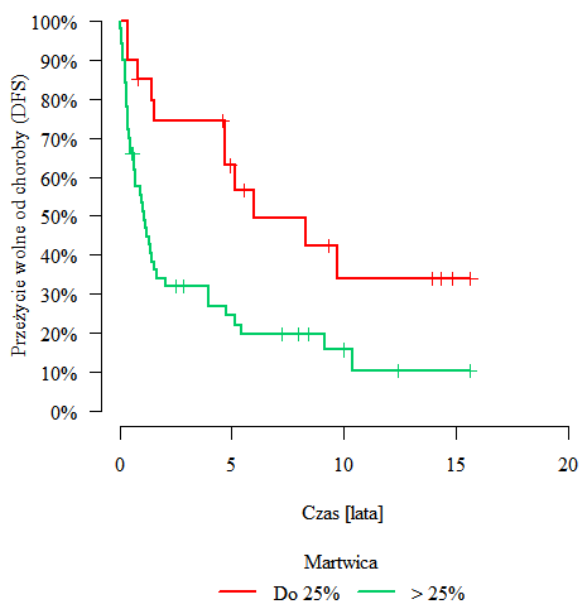
5.10.2 Przeżycie wolne od choroby a obecność martwicy

Mediana przeżycia wolnego od choroby dla guzów z niewielką martwicą do 25% wynosiła 6 lat, a dla guzów z rozległą martwicą > 25% - 1,15 lat (tabela 41). Krzywe przeżycia dla analizowanych grup różniły się istotnie (rycina 12). Gorsze rokowania były w grupie z martwicą powyżej 25%, a lepsze w grupie z martwicą do 25%.

Tabela 41. Przeżycie wolne od choroby wobec rozległości martwicy

Martwica	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Do 25%	20	11	85,00%	74,37%	62,93%	6	p=0,004*
>25%	50	40	55,35%	31,94%	24,57%	1,12	

p - test LR (log-rank)



Rycina 12. Krzywe przeżycia czasu wolnego od choroby oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec rozległości martwicy

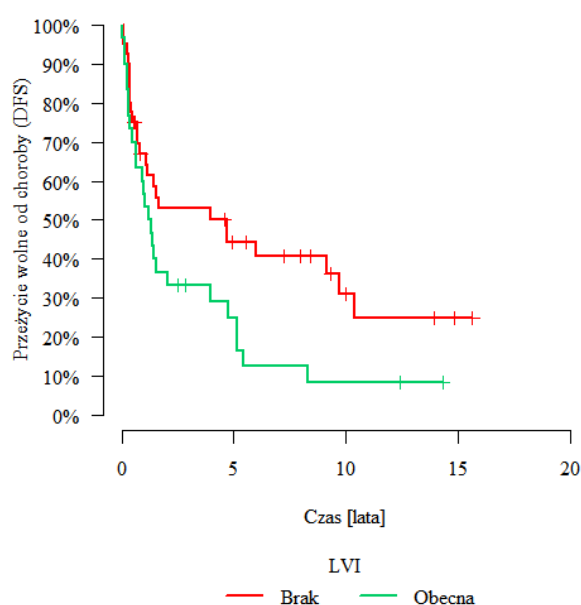
5.10.3 Przeżycie wolne od choroby a inwazja naczyń limfatycznych i krwionośnych

Stwierdzono istotną statystycznie różnicę w DFS u chorych z obecnością zatorów z komórek raka w świetle naczyń limfatycznych i bez ($p=0,036$); gorsze rokowania zaobserwowano w grupie z LVI (tabela 42, rycina 13).

Tabela 42. Przeżycie wolne od choroby wobec inwazji naczyń limfatycznych

LVI	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Brak	40	25	66,96%	53,01%	44,31%	4,68	p=0,036
Obecna	30	26	60,00%	33,33%	25,00%	1,3	

p - test LR (log-rank)



Rycina 13. Krzywe przeżycia czasu wolnego od choroby oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec inwazji naczyń limfatycznych

Natomiast krzywe DFS chorych z inwazją naczyń krwionośnych i bez inwazji nie różniły się istotnie ($p=0,324$) (tabela 43).

Tabela 43. Przeżycie wolne od choroby wobec inwazji naczyń krwionośnych

BVI	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Brak	21	13	85,15%	51,09%	38,93%	3,98	p=0,324
Obecna	49	38	55,10%	40,82%	34,01%	1,39	

p - test LR (log-rank)

5.10.4 Przeżycie wolne od choroby a typ komponentu nabłonkowego

Mediana przeżycia wolnego od choroby była najniższa w grupie z komponentem wielkokomórkowym (0,35 lat), a najwyższa w grupie z komponentem płaskonabłonkowym (3,98 lat), ale różnice nie były istotne statystycznie (tabela 44).

Tabela 44. Przeżycie wolne od choroby wobec typu histologicznego komponentu nabłonkowego

Typ komponentu nabłonkowego	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
AC	18	15	55,56%	30,86%	18,52%	1,01	p=0,499
LCC	6	4	33,33%	33,33%	33,33%	0,35	
SCC	30	21	69,84%	52,38%	48,64%	3,98	
ME	2	2	100,00%	>max obs.	>max obs.	1,3	

>max obs. - przekracza maksymalną długość obserwacji w tej grupie; p - test LR (log-rank)

5.10.5 Przeżycie wolne od choroby a typ histologiczny komponentu mięsakowatego

Mediana przeżycia wolnego od choroby była najniższa w grupie guzów z utkaniem olbrzymiokomórkowym (0,64 lata), ale różnice w DFS nie były istotne statystycznie (p=0,076) (tabela 45).

Tabela 45. Przeżycie wolne od choroby a typ histologiczny komponentu mięsakowatego

Typ komponentu mięsakowatego	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
gc	11	9	32,73%	21,82%	10,91%	0,64	p=0,076
sc	24	17	79,17%	54,17%	45,14%	3,98	
ms	35	25	62,36%	43,65%	36,63%	1,45	

p - test LR (log-rank)

Rozległość komponentu mięsakowatego nie miała wpływu na DFS (p=0,56, HR 0,997; 95%CI 0,989-1,006).

5.10.6 Przeżycie wolne od choroby a ekspresja markerów immunohistochemicznych transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej

Nie wykazano znamiennych statystycznie różnic w czasie przeżycia wolnego od choroby w zależności od ekspresji wimentyny i cytokeratyny AE1/AE3 w wyodrębnionych grupach ($p=0,874$), jednak mediana DFS była najwyższa w grupie bez komponentu nabłonkowego (tabela 46).

Tabela 46. Przeżycie wolne od choroby dla wyodrębnionych grup w oparciu o ekspresję AE1/AE3 i wimentyny

IHC (Wimentyna)	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Grupa 1 E(-), S(+)	18	13	66,67%	44,44%	33,33%	1,39	p=0,874
Grupa 2 E(+), S(+)	26	21	53,85%	38,46%	34,62%	1,17	
Grupa 3 Brak E	14	9	70,71%	55,00%	36,67%	4,68	
Grupa 4 E(-), S(-)	12	8	75,00%	42,86%	42,86%	1,67	

p - test LR (log-rank), E - komponent nabłonkowy, S - komponent mięsakowaty

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w DFS w zależności od ekspresji E-kadheryny oraz ZEB1 w komponente mięsakowatym co przedstawiono w tabeli 47 oraz tabeli 48. Nie stwierdzono również istotnych różnic w DFS w zależności od nasilenia ekspresji ZEB1.

Tabela 47. Przeżycie wolne od choroby wobec ekspresji E-kadheryny w komponente mięsakowatym

Odczyn z E-kadheryną	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Ujemny	39	30	58,97%	41,03%	32,82%	1,43	p=0,595
Dodatni	31	21	70,38%	48,16%	39,73%	1,67	

p - test LR (log-rank)

Tabela 48. Przeżycie wolne od choroby wobec ekspresji ZEB 1 w komponentcie mięsakowatym

Odczyn z ZEB1	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Ujemny	32	23	63,95%	42,63%	34,45%	1,39	p=0,906
Dodatni	38	28	63,16%	44,74%	36,35%	1,55	

p - test LR (log-rank)

W zależności od stwierdzonej w komponentcie mięsakowatym ekspresji E-kadheryny oraz ZEB1, podzielono badaną grupę na cztery podgrupy: ZEB1+/E-kadheryna-, ZEB1+/E-kadheryna+, ZEB1-/E-kadheryna+, ZEB1-/E-kadheryna-; nie stwierdzając istotnych różnic w krzywych przeżycia wolnego od choroby (p=0,239).

5.10.7 Przeżycie wolne od choroby a ekspresja PD-L1

Nie stwierdzono istotnych różnic w czasie DFS u chorych z dodatnią ekspresją PD-L1 i brakiem ekspresji (p=0,363) oraz w zależności od nasilenia reakcji (tabela 49).

Tabela 49. Przeżycie wolne od choroby w zależności od ekspresji PD-L1

PD-L1	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Odczyn ujemny (<1%)	28	21	78,57%	46,43%	38,69%	1,55	p=0,468
Odczyn słaby (1-49%)	13	9	76,15%	57,12%	38,08%	3,98	
Odczyn silny (≥50%)	29	21	43,97%	36,64%	32,06%	0,81	

p - test LR (log-rank)

W analizie dwuczynnikowej badano zależność przeżycia wolnego od choroby od ekspresji PD-L1 w połączeniu z ekspresją ZEB1 oraz z inwazją naczyń krwionośnych lub limfatycznych i nie wykazano istotnych znamienne różnic (p>0,05). Natomiast w połączeniu z rozległością martwicy ekspresja PD-L1 miała wpływ na DFS (tabela 50). Najniższe krzywe

przeżycia stwierdzono w grupie z martwicą powyżej 25% i dodatnią ekspresją PD-L1, a najwyższe w grupie martwicą do 25% i PD-L1(-).

Tabela 50. Przeżycie wolne od choroby w zależności od rozległości martwicy i ekspresji PD-L1

Martwica/ PD-L1	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
Martwica do 25%, PD-L1-	8	4	100,00%	87,50%	58,33%	8,3	p=0,023
Martwica >25%, PD-L1-	20	17	70,00%	30,00%	30,00%	1,19	
Martwica do 25%, PD-L1+	12	7	75,00%	65,62%	65,62%	6	
Martwica >25%, PD-L1+	30	23	45,00%	33,75%	19,29%	0,7	

p - test LR (log-rank)

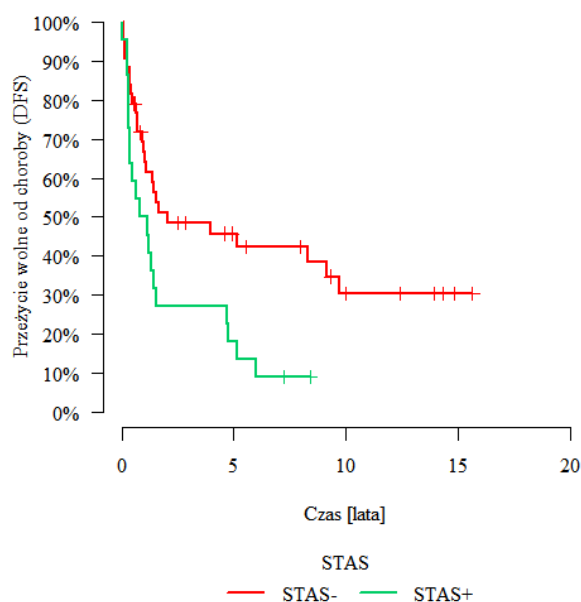
5.10.8 Przeżycie wolne od choroby a STAS

Mediana przeżycia wolnego od choroby dla grupy z obecnymi cechami szerzenia się raka drogami powietrznymi tj. STAS(+) wyniosła 0,81 lat i była znamienne statystycznie różna od mediany dla grupy STAS(-): 2,03 lata (p=0,01) (tabela 51, rycina 14). Gorsze rokowania co do DFS były w grupie STAS(+), a lepsze w grupie STAS(-).

Tabela 51. Przeżycie wolne od choroby wobec obecności cech szerzenia się raka drogami powietrznymi STAS

STAS	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
STAS(-)	43	26	69,10%	48,62%	45,76%	2,03	p=0,01*
STAS(+)	22	20	50,00%	27,27%	18,18%	0,81	

p - test LR (log-rank)



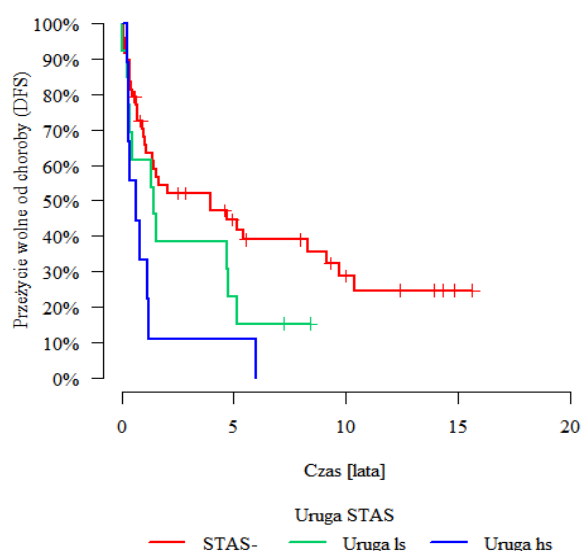
Rycina 14. Krzywe przeżycia czasu wolnego od choroby oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec szerzenia się raka drogami powietrznymi STAS

Nie stwierdzono istotnych różnic w DFS pomiędzy grupami chorych z większą liczbą ognisk raka w przestrzeniach powietrznych (hs) i mniejszą (ls) ($p=0,148$), ale krzywe przeżycia dla analizowanych grup w porównaniu z grupą STAS(-) różniły się istotnie. Najgorsze rokowania co do DFS były w grupie hs, a najlepsze w grupie STAS(-) (tabela 52, rycina 15).

Tabela 52. Przeżycie wolne od choroby wobec ilości ognisk raka w przestrzeniach powietrznych, wg Uruga i wsp.

STAS	Liczba pacjentów	Liczba zdarzeń	Przeżycie wolne od choroby [lata]				p
			1	3	5	Mediana	
STAS(-)	48	31	70,30%	52,16%	44,57%	3,98	p=0,006
ls	13	11	61,54%	38,46%	23,08%	1,43	
hs	9	9	33,33%	11,11%	11,11%	0,67	

p - test LR (log-rank)



Rycina 15. Krzywe przeżycia wolnego od choroby oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec ilości ognisk raka w przestrzeniach powietrznych, wg Uruga i wsp.: STAS(-), ls, hs

5.10.9 Analiza wieloczynnikowa predyktorów przeżycia wolnego od choroby

Analiza wpływu zmiennych ilościowych na czas przeżycia wolnego od choroby wykonana za pomocą modelu hazardów proporcjonalnych Coxa wykazała, że istotnymi ($p < 0,05$) niezależnymi predyktorami DFS są:

- martwica $> 25\%$: $HR=3,551$, a więc podnosi ona prawdopodobieństwo wystąpienia zdarzenia w każdym czasie 3,551 razy w stosunku do martwicy do 25%;
- typ komponentu nabłonkowego płaskonabłonkowy: $HR=0,31$, a więc obniża on prawdopodobieństwo wystąpienia zdarzenia w każdym czasie o 69% w stosunku do raka gruczołowego;
- grupa 4 IHC tj. grupa bez ekspresji wimentyny w komponentie nabłonkowym i mięsakowatym: $HR=4,888$, a więc podnosi ona prawdopodobieństwo wystąpienia zdarzenia w każdym czasie 4,888 razy w stosunku do grupy 1 tj. z dodatnią ekspresją wimentyny jedynie w komponentie mięsakowatym.

Analizę zaprezentowano w tabeli 53 - wyniki przedstawiono w postaci wartości parametrów HR z 95-procentowym przedziałem ufności.

Tabela 53. Analiza wpływu zmiennych ilościowych na przeżycie wolne od choroby - DFS

Cecha		HR	95%CI		p
Stopień zaawansowania	I	1	ref.		
	II	2,934	0,817	10,539	0,099
	III/IV	1,335	0,359	4,965	0,666
Martwica	Do 25%	1	ref.		
	>25%	3,551	1,276	9,882	0,015*
LVI	Brak	1	ref.		
	Obecna	1,129	0,546	2,337	0,743
BVI	Brak	1	ref.		
	Obecna	1,343	0,548	3,29	0,519
Grupa IHC w zależności od ekspresji wimentyny w komponentcie nabłonkowym i mięsakowatym	Grupa 1	1	ref.		
	Grupa 2	2,731	0,744	10,032	0,13
	Grupa 3	0,464	0,127	1,689	0,244
	Grupa 4	4,888	1,26	18,964	0,022*
Typ komponentu nabłonkowego	AC	1	ref.		
	LCC	0,533	0,116	2,453	0,419
	SCC	0,31	0,122	0,784	0,013*
	ME	0,398	0,061	2,615	0,338
Typ komponentu mięsakowatego	gc	1	ref.		
	sc	0,633	0,164	2,444	0,507
	ms	0,544	0,195	1,522	0,247
E-cad S	Ujemny	1	ref.		
	Dodatni	0,406	0,116	1,417	0,157
ZEB1 S	Ujemny	1	ref.		
	Dodatni	0,855	0,236	3,099	0,811
PD-L1	PD-L1(-)	1	ref.		
	PD-L1(+)	0,996	0,431	2,303	0,992
STAS	STAS(-)	1	ref.		
	STAS(+)	1,888	0,915	3,895	0,085

*zależność istotna statystycznie ($p < 0,05$); p - wieloczynnikowy model hazardów proporcjonalnych Coxa

6. Dyskusja

Rak wielopostaciowy (PC) należy do grupy rzadkich raków mięsakowatych płuc, które charakteryzują się mieszanym nabłonkowym i mięsakowatym utkaniem histologicznym. Po raz pierwszy terminu „rak wielopostaciowy - *pleomorphic carcinoma*” użyła Fishback i wsp. w roku 1994, opisując grupę 78 raków płuca z różnicowaniem wrzecionowato- i olbrzymiokomórkowym (18). Autorzy podali opis kliniczno-patologiczny PC, zwrócili uwagę na odrębność tej jednostki i konieczność zmiany ówczesnej klasyfikacji WHO. W swoim badaniu arbitralnie przyjęli poziom 10% obecności komórek wrzecionowatych lub olbrzymich jako kryterium różnicujące z innymi NSCLC, w których takie komórki mogą okazjonalnie występować. W roku 1999 WHO znacząco zmieniła podział raków z elementami mięsakowatymi (30). Ze względu na rzadkość występowania, zmiany nazewnictwa i różnorodność morfologiczną tych postaci raka, dane zawarte w piśmiennictwie są czasami trudne do porównania, a nawet rozbieżne. Ponadto w niektórych pracach, ze względu na zmiany w klasyfikacji WHO, nazwy rak wielopostaciowy i mięsakowaty są stosowane wymiennie (15), (17), (88). Wiele prac dotyczy raków mięsakowatych płuca bez wyodrębnienia poszczególnych typów nowotworów, co także utrudnia analizę (6), (8), (10), (12), (89), (90). Dodatkowo rak wielopostaciowy, ze względu na różnorodny obraz morfologiczny może być zdiagnozowany głównie w oparciu o materiał operacyjny, a jedynie w szczególnych, rzadkich sytuacjach w materiale oligobiopsyjnym, co znacznie ogranicza możliwość ustalenia rzeczywistej częstości jego występowania, ocenę przebiegu i rokowanie.

6.1 Obraz kliniczno-patologiczny

6.1.1 Dane kliniczne

Opublikowano trzy badania oparte na danych z rejestrów nowotworowych (ang. *Surveillance, Epidemiology and End Results*; SEER) dotyczące cech kliniczno-patologicznych omawianej grupy raków. W badaniu Yin i wsp. częstość występowania raka wielopostaciowego wyniosła 0,1% (7), natomiast Rahoum i wsp. oraz Yendamuri i wsp. analizowali większą populację, w której raki mięsakowate (bez określenia podtypu) stanowiły odpowiednio 0,52% i 0,4% NSCLC (8), (91). W materiale operacyjnym udział raków wielopostaciowych wahał się od 0,75 % do 2,1% (6), (9), (10).

Częstość rozpoznawania raków mięsakowatych w Polsce, z wyłączeniem mięsakoraka i płucnego *blastoma*, wg danych uzyskanych do bieżącego badania z Krajowego Rejestru Raka Płuc, była podobna i wynosiła 1,6% w materiale operacyjnym.

Uważa się, że PC dominuje u mężczyzn, lokalizuje się z podobną częstością w obu płucach, z wyraźną przewagą w płatach górnych (6), (7), (9), (12), (14), (15), (20), co obserwowane było także w prezentowanej pracy. Badana grupa obejmowała 67 mężczyzn i 40 kobiet. W 51,4% przypadków nowotwór był umiejscowiony w płatach górnych.

Wielu autorów podkreśla silny związek rozwoju raka wielopostaciowego z paleniem papierosów, co wynika zarówno z wywiadu klinicznego, jak i stwierdzanych w badaniach molekularnych mutacji (6), (7), (9), (12), (14), (15), (16), (19), (36), (40), (50). Podobnie w badanej grupie, 92,6% chorych było aktywnymi lub byłymi palaczami, a mediana paczkolet wyniosła 40.

Objawy kliniczne w przebiegu raka wielopostaciowego są takie same jak towarzyszące innemu rakom płuca. Podobnie jak w analizowanej grupie pacjentów, najczęściej obejmują: kaszel, krwiotłucie, utratę masy ciała, męczliwość. Dodatkowo w przebadanej grupie chorych zanotowano rzadkie objawy takie jak: rwa barkowa, pocenie oraz epizody omdlenia związane z zamknięciem oskrzela przez guz wewnątrzoskrzelowy. Jedynie dwóch chorych zgłaszało gorączkę i przewlekające się zapalenia płuc, pomimo że lokalizację wewnątrzoskrzelową stwierdzono w 7 przypadkach. W ok. 15-20% przypadków raki wielopostaciowe nie dają objawów i wykrywane są przypadkowo (9), (10), (13), (14). W prezentowanej pracy pacjenci bezobjawowi stanowili 26%.

Średnia wielkość (i mediana wielkości) raka wielopostaciowego w wielu badaniach wynosiła 5-6cm, a większość chorych była w zaawansowanym stadium choroby (6), (7), (8), (9), (12), (13), (15), (20), (23), (24). W badaniach opartych o bazę SEER wykazano, że w momencie diagnozy raki wielopostaciowe miały większą średnicę niż inne niemięsakowate NSCLC (5cm vs 3,5cm) oraz wyższy stopień zaawansowania - mniejszą grupę stanowili chorzy w I stopniu zaawansowania, odpowiednio: 14,2% PC vs 20,7% NSCLC (7). Badania porównawcze przeprowadzone w oparciu o własny materiał operacyjny przedstawione przez Mochizuki i wsp. oraz Martin i wsp. potwierdziły istotną statystycznie różnicę w wielkości guza (5cm vs 3cm) i stopniu zaawansowania pomiędzy rakiem wielopostaciowym a innymi podtypami NSCLC (9), (15). Mochizuki i wsp. zaobserwowali również większą

częstość zajęcia opłucnej (naciek lub płyn w jamie opłucnowej) w PC niż w innych NSCLC 67% vs 38% oraz inwazji naczyń krwionośnych 85% vs 53% ($p < 0,05$) (9).

W analizowanej grupie częstość występowania tych cech również była wysoka - u 71% chorych zanotowano naciekanie opłucnej, a inwazję naczyń krwionośnych u 73% pacjentów.

6.1.2 Obraz mikroskopowy

Fishback i wsp., a także inni badacze, podkreślają dużą różnorodność i bogactwo obrazów morfologicznych raka wielopostaciowego i innych raków mięsakowatych w stosunku do pozostałych postaci NSCLC (12), (13), (18), (23), (33), (37). Występująca różnorodność morfologiczna jest przyczyną problemów diagnostycznych, co znajduje wyraz w częstości rozpoznawania poszczególnych typów raków mięsakowatych. Różnice te widać na przykładzie prac Roesel i wsp. oraz Rahouma i wsp. W badanych przez nich grupach raki wielopostaciowe stanowiły 23,9% vs 13,5%, mięsakoraki 56,5% vs 11,5%, raki olbrzymiokomórkowe oraz raki wrzecionowatokomórkowe razem 17,4% vs 72,9% (8), (10).

W prezentowanej grupie pacjentów rozpoznano 100 przypadków raka wielopostaciowego, 5 raka olbrzymiokomórkowego i 2 raka wrzecionowatokomórkowego. W wyniku reklasyfikacji na wstępnym etapie badania odrzucono 5 przypadków mięsakoraka. Występowanie poszczególnych podtypów raka mięsakowatego jest zgodne z danymi przedstawianymi przez Travis'a i wsp., którzy podają, że rak wielopostaciowy jest najczęstszym podtypem w grupie raków mięsakowatych i utrzymują, że monomorficzne postacie raka olbrzymio- lub wrzecionowatokomórkowego są bardzo rzadkie, a skąpy komponent nabłonkowy może być przeoczony lub niemożliwy do rozpoznania bez dodatkowych badań immunohistochemicznych (11), (37). Tezę tę potwierdzają także wyniki niniejszego badania: w ok. 18% przypadków komponent nabłonkowy stanowił mniej niż 10% utkania, a w 7,5% mniej niż 5%. W jego identyfikacji pomocne były odczyny immunohistochemiczne z markerami nabłonkowymi. Ponadto w 8 przypadkach nasilone zmiany myksoidne i chrzęstnopodobne w podścielisku przypominały mięsakoraka. Podkreślić należy, że definicja raka olbrzymiokomórkowego WHO z 2015r. (11) oraz raka wrzecionowatokomórkowego, jako guzów zawierających „prawie wyłącznie” (ang. *almost pure*) określony typ komórek, nie była precyzyjna i stwarzała pole do własnej interpretacji,

co także może być przyczyną różnic w cytowanych powyżej badaniach. Aktualna klasyfikacja WHO z 2021r. definiuje wymienione typy raka jako podtypy raka wielopostaciowego (3).

Ze względu na złożony obraz morfologiczny również w badaniach dotyczących zróżnicowania histologicznego poszczególnych komponentów nabłonkowych i mięsakowatych wyniki są różnorodne. Rosii i wsp. (12) oraz Yuki i wsp. (24) stwierdzili w komponente mięsakowatym utkanie: wrzecionowatokomórkowe odpowiednio w 29,5% vs 51%, olbrzymiokomórkowe 19,5% vs 24,5% i mieszane 51% vs 24,5%, a w komponente nabłonkowym utkanie gruczolakoraka 27,5% vs 55,5%, raka wielkokomórkowego 35% vs 26,5% i płaskonabłonkowego 23,5% vs 11%, mieszane 14% vs 0% przypadków. Wyniki te odzwierciedlają trudności w diagnostyce raka wielopostaciowego.

W przedstawionej pracy w komponente mięsakowatym dominowało utkanie mieszane (56%), a najrzadsze było utkanie olbrzymiokomórkowe (16%), natomiast komponent nabłonkowy najczęściej był płaskonabłonkowy (46%), rzadziej gruczolowy (35%), wielkokomórkowy (12%) lub mieszany (7%). Utkanie płaskonabłonkowe występowało głównie w połączeniu z utkaniem wrzecionowatokomórkowym, a najrzadziej z olbrzymiokomórkowym. Uzyskane wyniki są zbieżne z prezentowanymi przez Rossi i wsp. (12). Różnice w częstości występowania poszczególnych podtypów histologicznych raka mogą wynikać z trudności w identyfikacji nisko zróżnicowanego komponentu nabłonkowego, z subiektywności oceny, a także z zastosowania badań immunohistochemicznych, które pomagają w ustaleniu kierunku różnicowania komórek. Należy podkreślić, że odróżnienie poszczególnych postaci histologicznych tkanki nabłonkowej i mięsakowatej, może być bardzo trudne, a określenie rozległości tkanki skomplikowane ze względu na płynne przechodzenie jednych pól różnicowania w inne. Tymczasem Pelosi i wsp. uważają, że komponent pleomorficzny stanowiący powyżej 50% guza koreluje z wyższym stopniem zaawansowania niż I ($p=0,012$) (28).

W prezentowanej pracy nie potwierdzono tej obserwacji, nie wykazano związku postaci morfologicznej i rozległości tkanki mięsakowatej oraz nabłonkowej z wielkością guza i stopniem zaawansowania oraz z inwazją naczyń krwionośnych ($p>0,05$). Inwazja naczyń limfatycznych występowała częściej w rakach z utkaniem gruczolowo-płaskonabłonkowym niż wielkokomórkowym ($p=0,028$).

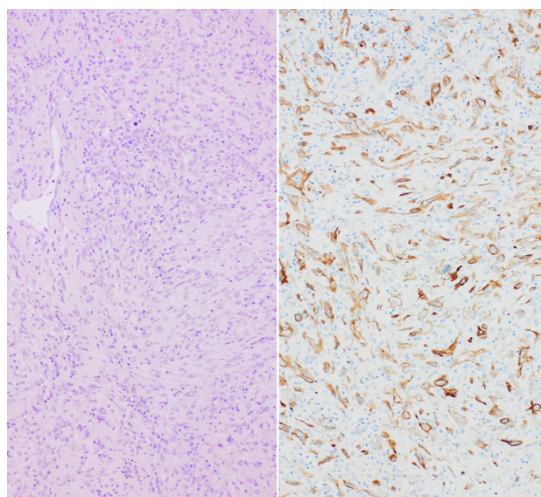
W opublikowanych badaniach typ utkania nabłonkowego i mięsakowatego nie miał związku z przeżyciem całkowitym oraz przeżyciem wolnym od choroby czy progresji (9), (12) (18). Część badaczy obserwowała jednak krótsze przeżycie pięcioletnie w grupie z komponentem raka wielkokomórkowego oraz dłuższe przy utkaniu raka gruczołowego, ale różnice nie były znamienne statystycznie (9), (16), (24). Z kolei w badaniach Veira i wsp. komponent inny niż płaskonabłonkowy był związany z dłuższym OS (HR=2,51; 95%CI,1,24-5,06, p=0,01) (17).

W przedstawianym badaniu mediana przeżycia całkowitego była najwyższa w grupie z komponentem raka gruczołowego, a najniższa w grupie z mieszanym komponentem gruczołowo-płaskonabłonkowym (6 vs 0,34 lata) (p=0,006). Natomiast mediana DFS była najniższa w grupie z komponentem wielkokomórkowym, a najwyższa z komponentem płaskonabłonkowym (0,35 vs 3,98 lat), ale różnica nie była znamienna statystycznie (p>0,05). Obserwowano także tendencję do krótszego przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od choroby w guzach z utkaniem olbrzymiokomórkowym wobec guzów z innymi typami utkania mięsakowatego, odpowiednio: OS 0,52 vs 2,79 lat oraz DFS 0,64 vs 3,98lat (p>0,05).

Z przeprowadzonej analizy wynika, że pomimo trudności diagnostycznych konieczne jest określenie typu histologicznego komponentu nabłonkowego i mięsakowatego, gdyż może to mieć znaczenia dla rokowania i dalszych decyzji terapeutycznych. Jednak wiarygodne określanie rozległości poszczególnych komponentów nie jest możliwe, a dodatkowo nie ma istotnego znaczenia klinicznego.

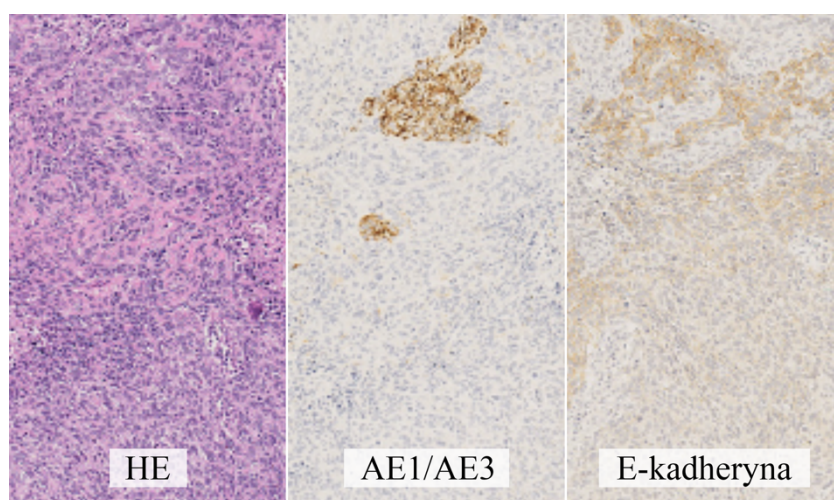
6.1.3 Badania immunohistochemiczne

Badania immunohistochemiczne mogą być bardzo pomocne w diagnostyce podtypów raka w PC oraz w diagnostyce różnicowej. W omawianym badaniu, podobnie jak w innych doniesieniach (12), (23), (33), (34), (35), zaobserwowano silną ekspresję AE1/AE3 nieco częściej w komponentie nabłonkowym (100%) niż mięsakowatym (84%). Dodatnia ekspresja AE1/AE3 ułatwiała zlokalizowanie komponentu nabłonkowego, trudnego do odróżnienia w badaniu HE. Ponadto reakcja z cytokeratyną była bardzo pomocna w różnicowaniu utkania wrzecionowatokomórkowego od nasilonego włóknienia, często spotykanego w raku wielopostaciowym, co podkreślali w swoim opracowaniu także Fishback i wsp. (18) (fot. 20).



Fot. 20 Dodatnia reakcja AE1/AE3 w komponencie wrzecionowatym ułatwia różnicowanie z reakcją desmoplastyczną podścieliska. Barwienie HE i barwienie IHC: AE1/AE3, pow. x200

Ekspresja E-kadheryny była wyraźnie słabsza i rzadsza w komponencie mięsakowatym niż nabłonkowym. Reakcję silnie nasiloną stwierdzono w 94% przypadków w komponencie nabłonkowym i w 30% w komponencie mięsakowatym. Uważa się, że jest to wyrazem zachodzących w guzie procesów transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej (4), (28), (77). Ekspresja E-kadheryny była również pomocna w różnicowaniu komponentu nabłonkowego i mezenchymalnego (fot. 21).



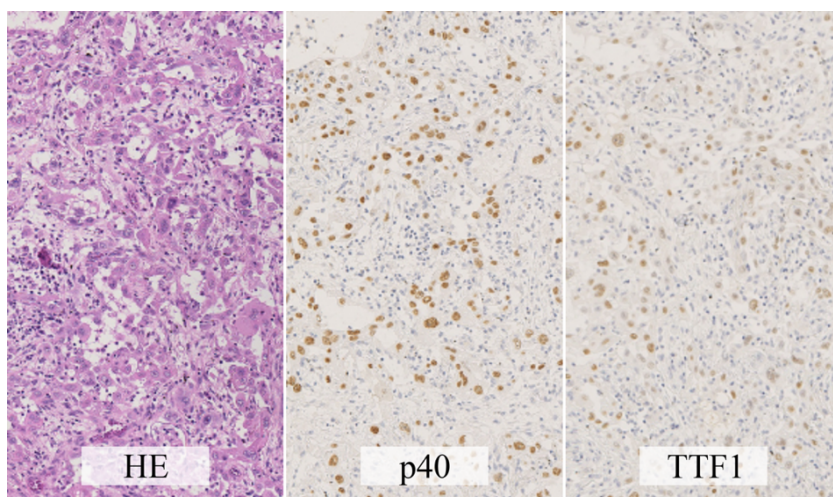
Fot. 21 Dodatnia reakcja z cytokeratynami pomaga odnaleźć komponent nabłonkowy (ten sam obszar guza). Barwienie HE i barwienie IHC: AE1/AE3 i E-kadheryna, pow. x200

Należy podkreślić, że brak ekspresji markerów nabłonkowych, w tym cytokeratyn o szerokim spektrum, nie wyklucza rozpoznania raków wielopostaciowych (3), (37). W analizowanej grupie chorych, w 3 przypadkach zawierających utkanie wrzecionowato- i olbrzymiokomórkowe, nie stwierdzono dodatniej reakcji z cytokeratynami.

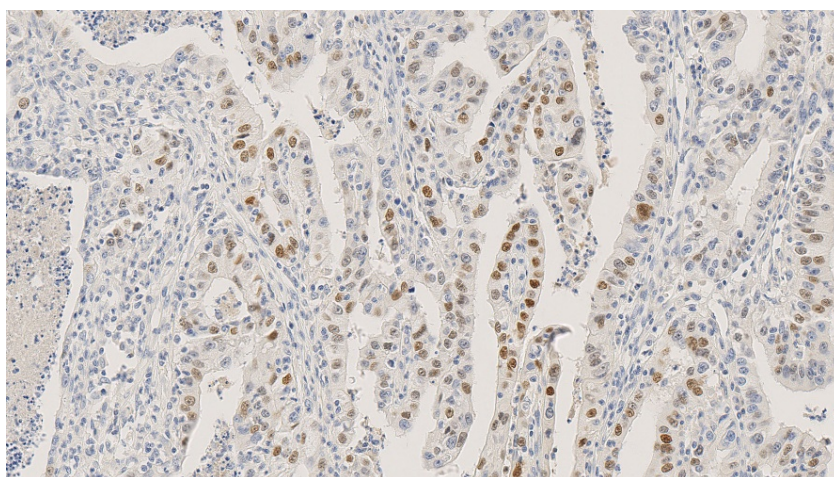
Ekspresja markerów nabłonkowych specyficznych dla raka gruczołowego (TTF1) i płaskonabłonkowego (p63/ p40) była badana w kilku pracach w oparciu o zróżnicowaną liczbę przypadków. Weissferdt i wsp. w grupie 86 raków mięsakowatych w 59% guzów wykazali ekspresję TTF1 w komponentcie nabłonkowym i w 41% w komponentcie mięsakowatym, natomiast p40 odpowiednio w 24% i 8% przypadków (34). Forest i wsp., badając immunohistochemicznie i molekularnie 36 raków mięsakowatych, z podobnymi typami histologicznymi, stwierdzili dodatnią ekspresję TTF1 przede wszystkim w komponentcie nabłonkowym w 31% guzów, a jedynie w jednym w komponentcie mięsakowatym. Dodatni odczyn p40 odnotowali w 17% przypadków w komponentcie nabłonkowym i w 11% w komponentcie mięsakowatym (36).

Przeciwnie do cytowanych autorów, w prezentowanym badaniu dodatnią ekspresję TTF i p40 stwierdzono zarówno w komponentcie nabłonkowym, jak i mięsakowatym, w podobnym odsetku przypadków: TTF1 w komponentcie nabłonkowym w 45%, a w mięsakowatym w 37% przypadków, natomiast p40 odpowiednio w 54% i 29% przypadków. Szczególną uwagę zwraca silna ekspresja p40, pojawiająca się w przeważającej części przypadków w obu komponentach. Może to tłumaczyć wspomniany, stosunkowo wysoki, odsetek stwierdzonych raków płaskonabłonkowych w tym badaniu. Cytowani autorzy przyjęli, że dodatnia ekspresja TTF1 lub p40 kwalifikuje jednoznacznie daną zmianę do określonej postaci morfologicznej raka, a przypadki z ekspresją obu markerów kwalifikowano jako raki gruczołowo-płaskonabłonkowe.

W prezentowanym badaniu obserwowano bardziej złożony wzór ekspresji markerów. Dodatnią reakcję z TTF1 stwierdzono zarówno w utkaniu gruczołowym (93%), ale też w 6 przypadkach (15%) pierwotnie morfologicznie rozpoznanych jako płaskonabłonkowe (fot. 22), a ekspresję p40, poza utkaniem płaskonabłonkowym (97%), w 1 przypadku raka wielkokomórkowego (reakcja słaba, ogniskowa) oraz w 2 przypadkach raków gruczołowych (fot. 23).



Fot. 22 Koekspresja TTF1 i p40 w komórkach raka morfologicznie płaskonabłonkowego. Barwienie HE i barwienie IHC: p40 i TTF1, pow. x200



Fot. 23 Dodatnia ekspresja p40 w raku gruczołowym. Barwienie IHC: p40, pow. x200

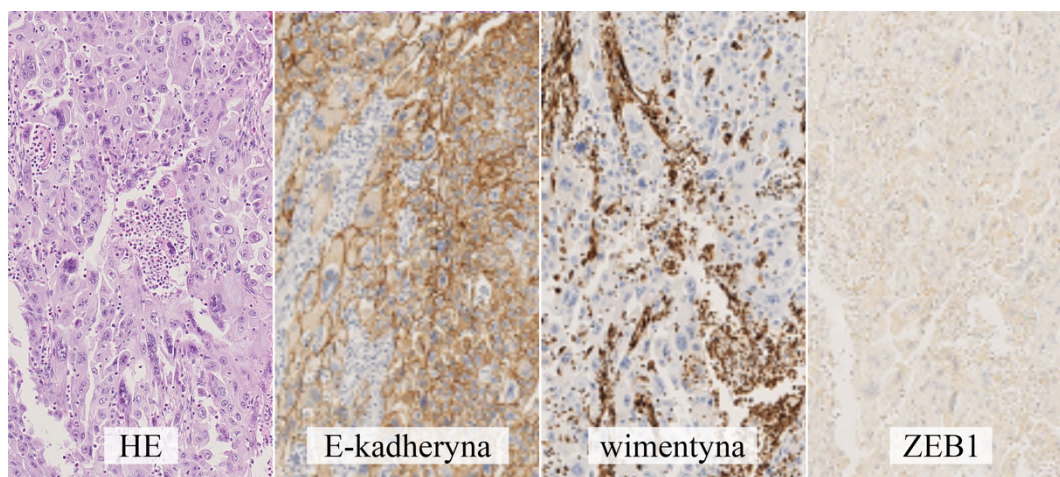
Podobną ekspresję TTF1 i p63 obserwował Vieira i wsp. w grupie 77 pacjentów z rakami mięsakowatymi (17). Dodatkowo w bieżącym badaniu obserwowano ekspresję obu markerów w różnych utkaniach tego samego guza: w 9 przypadkach w komponencie nabłonkowym była dodatnia reakcja z TTF1, a w mięsakowatym z p40, w 8 przypadkach sytuacja była odwrotna, natomiast w jednym guzie (wyłącznie o utkaniu olbrzymio- i wrzecionowatokomórkowym), w różnych polach, obserwowano ekspresję obu markerów. Nie znaleziono danych literaturowych odnoszących się do takiego zjawiska. Wydaje się, że może to być związane z różnokierunkowym różnicowaniem komórek raków wielopostaciowego.

Weissferdt i wsp. wysuwają tezę, że raki z dodatnią ekspresją TTF1 lub p40 w komponencie nabłonkowym i mięsakowatym powinny być klasyfikowane odpowiednio jako nisko zróżnicowane raki gruczołowe lub płaskonabłonkowe, a nie jako raki wielopostaciowe

czy mięsakowate, co pozwoli wybrać właściwą ścieżkę dalszego postępowania diagnostycznego i terapeutycznego (34). Tezę tę pośrednio potwierdzają Forest i wsp., którzy w przeprowadzonych badaniach molekularnych, w grupie raków mięsakowatych z różnicowaniem płaskonabłonkowym nie wykazali obecności mutacji kwalifikujących do terapii celowanych (36). Pelosi i wsp. proponują dołączenie do badanych markerów gruczołowych i płaskonabłonkowych wimentyny, której pojawienie się związane jest z zachodzącymi w guzie procesami transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej, co według autorów, jest kluczowe dla rozpoznania raka wielopostaciowego. W badaniu obejmującym 20 przypadków raka wielopostaciowego i 48 przypadków innych raków niedrobnokomórkowych płuca, w materiale oligobiopsyjnym i operacyjnym wykazali, że silna ekspresja wimentyny obecna w licznych komórkach, obejmująca cytoplazmę w sposób rozlany, a nie częściowy, odróżnia raka wielopostaciowego od innych niemięsakowatych postaci NSCLC z obecnością komórek pleomorficznych i pozwala na postawienie pewnej diagnozy PC, nawet w materiale przedoperacyjnym (25).

W prezentowanym materiale ekspresja wimentyny była silnie wyrażona i rozlana w komponencie mięsakowatym w 86% przypadków, natomiast w komponencie nabłonkowym w 58%, z czego w połowie przypadków nasilenie reakcji (natężenie $\times$ rozległość) było wysokie. Potwierdzają to wnioski Pelosi i wsp., iż rozlana dodatnia ekspresja wimentyny, szczególnie w materiale oligobiopsyjnym, może być bardzo pomocna, a w połączeniu z obrazem morfologicznym nawet decydująca o ostatecznym rozpoznaniu PC.

Należy zauważyć, że w bieżącym badaniu w 15 przypadkach nie stwierdzono ekspresji wimentyny w żadnym z komponentów, natomiast widoczna była rozlana reakcja z markerami nabłonkowymi AE1/AE3, E-kadheryna, którym w 3 przypadkach towarzyszyła ekspresja TTF1 i w 12 - p40. W żadnym z przypadków nie zaobserwowano dodatniej reakcji z przeciwciałem ZEB1 - innym markerem transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej - a ekspresja TTF1 lub p40 była silnie wyrażona w obu komponentach (fot. 24).



Fot. 24 Przypadek z obecnością komórek pleomorficznych, z dodatnią ekspresją markerów nabłonkowych i ujemną markerów EMT. Barwienie HE i barwienie IHC, pow. x200

Wydaje się, że przypadki te rzeczywiście powinny być uznane za raki gruczołowe lub płaskonabłonkowe, pomimo spełniania kryteriów morfologicznych raka wielopostaciowego. Pelosi i wsp. w innej pracy sugerują, że arbitralnie przyjęty przez WHO poziom 10% komórek pleomorficznych wymagany do rozpoznania raka wielopostaciowego, może nie być wystarczający do wyodrębnienia raków o rzeczywiście odmiennej biologii niż inne postacie NCSLC (28).

W przebadanej grupie chorych nie stwierdzono różnicy w medianie OS i DFS w rakach bez ekspresji wimentyny, w stosunku do raków z ekspresją dodatnią, ale ze względu na niewielką liczebność grupy ujemnej wynik ten może nie być miarodajny. Cytowani powyżej autorzy nie analizowali badanych grup pod kątem OS i DFS (28), (34), (36).

Rozpoznanie raka wielopostaciowego wg klasyfikacji WHO opiera się na cechach morfologicznych (3). Na podstawie uzyskanych wyników wydaje się, że stosowanie panelu obejmującego minimum trzy markery IHC: TTF1, p40 i wimentynę może być szczególnie pomocne w diagnostyce PC, zwłaszcza w przypadkach oceny drobnego materiału oligobiopsyjnego i cytobloczków.

6.1.4 Martwica

Martwica w raku wielopostaciowym jest bardzo częstym zjawiskiem, obserwowanym w ok. 89-100% przypadków. Zwykle rozlegle zajmuje guz, obejmując ponad 25% (średnio 40%) jego powierzchni, często ma postać martwicy geograficznej (9), (12), (17).

W prezentowanej pracy martwica średnio obejmowała 42% guza, w 74% przypadków zajmowała ponad 25% powierzchni nowotworu. Wykazano znamienne statystyczny związek rozległości martwicy ze stopniem zaawansowania patologicznego i klinicznego choroby ($p<0,05$). Im większe było nasilenie martwicy tym stopień zaawansowania raka był wyższy.

W badaniu Moschizuki i wsp. oraz Yokoyama i wsp. rozległa martwica powyżej 25% była jednym z niezależnych czynników prognostycznych przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od choroby (9), (64). Z kolei Vieira i wsp. w podobnie liczebnej grupie nie wykazali takiej zależności (17).

W analizowanej grupie chorych mediany OS dla guzów z martwicą do 25% i powyżej były wyraźnie różne (8,3 vs 1.55 lat), jednak nie była to różnica znamienna statystycznie. Natomiast rozległa martwica $> 25\%$ była niezależnym predyktorem zwiększającym ryzyko nawrotu choroby lub zgonu ($HR=3,551$; 95%CI, 1,276-9,882; $p=0,015$). Ocena rozległości martwicy w PC ma zatem istotne znaczenie i powinna być ujęta w raporcie badania histopatologicznego.

6.1.5 Inwazja naczyń krwionośnych i limfatycznych

Moschizuki i wsp. stwierdzili większą częstość inwazji naczyń krwionośnych w raku wielopostaciowym niż w innych postaciach NSCLC 86% vs 53% ($p<0,05$) i podobną inwazji naczyń limfatycznych 39% vs 40% (9). Yuki i wsp. obserwowali inwazję naczyń krwionośnych w 64,4% i limfatycznych w 33,3% raków wielopostaciowych. Autorzy zwrócili uwagę, że nawet u chorych bez przerzutów w węzłach chłonnych (N0) i przerzutów odległych (M0) inwazja naczyń krwionośnych była obecna w 57,1% przypadków, co może być przyczyną gorszego przeżycia całkowitego pacjentów z rakiem wielopostaciowym i cechą N0, w stosunku do podobnej grupy chorych z NSCLC (24).

W prezentowanej grupie inwazja naczyń krwionośnych także była zjawiskiem częstszym niż naczyń limfatycznych: 73% vs 48%. Naciekanie naczyń krwionośnych stwierdzono w 70% przypadków chorych z cechą N0, z czego w ok. 60% towarzyszyło mu zajęcie naczyń limfatycznych. Inwazja naczyń krwionośnych wiązała się z większym wymiarem guza, wyższym stopniem zaawansowania pT ($p<0,05$) oraz miała istotny statystycznie związek jedynie z OS ($p=0,048$). Porównywalne wyniki uzyskali Vieira i wsp. (17). Podobnie jak w doniesieniu Moschizuki i wsp. (9), również w prezentowanej pracy chorzy

z zajęciem naczyń limfatycznych mieli gorszą medianę przeżycia całkowitego oraz przeżycia wolnego od choroby ($p < 0,05$), natomiast przeciwnie do cytowanych autorów, w analizie wieloczynnikowej, inwazja naczyń krwionośnych i/lub limfatycznych nie była niezależnym czynnikiem prognostycznym OS i DFS. Podobne wyniki prezentuje także Roesel i wsp. (10). Liczba prac analizujących znaczenie rokownicze inwazji naczyń w rakach wielopostaciowych płuc jest ograniczona.

6.2 Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna

Raki mięsakowate płuc, w tym raki wielopostaciowe, są przykładem raków o rozbieżnym różnicowaniu komórek w kierunku nabłonkowym i mięsakowatym. Badania molekularne wykazały, że jest to związane z aktywacją mechanizmów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej w komórkach raka niedrobnokomórkowego na wczesnych etapach jego rozwoju lub w multipotencjalnej komórce macierzystej (4), (37), (66), (67), (72). Przemiana nabłonkowo-mezenchymalna jest indukowana w komórce przez różne zaburzenia molekularne oraz inne czynniki, do których należą: transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor- β* , TGF- β), Notch, Wnt, fibroblastyczny i nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. *fibroblast growth factor*, FGF; *epithelial growth factor*, EGF), w czym pośredniczą czynniki transkrypcyjne takie jak: SNAIL, ZEB, SLUG, TWIST i inne. W wyniku tej przemiany komórki raka tracą fenotyp nabłonkowy i zyskują fenotyp podścieliskowy, co manifestuje się utratą markerów nabłonkowych odpowiedzialnych za adhezję międzykomórkową tj. E-kadheryny, na rzecz pojawienia się markerów mezenchymalnych: wimentyny, N-kadheryny, fascyny (4), (5), (19), (28), (65), (67), (71), (72). Manzotti i wsp. badając szeroki panel genów w rakach mięsakowatych płuc wykazali różnice w ekspresji genów związanych z EMT w komponencie mięsakowatym i nabłonkowym, czemu towarzyszyła ekspresja mezenchymalnych czynników transkrypcyjnych TWIST1,2 i ZEB1 (66). Liu i wsp. uzyskali podobne wyniki badań molekularnych i stwierdzili w badaniu immunohistochemicznym wysoką ekspresję czynników transkrypcyjnych: TWIST1, SLUG i SNAIL w komórkach raków mięsakowatych płuc (67).

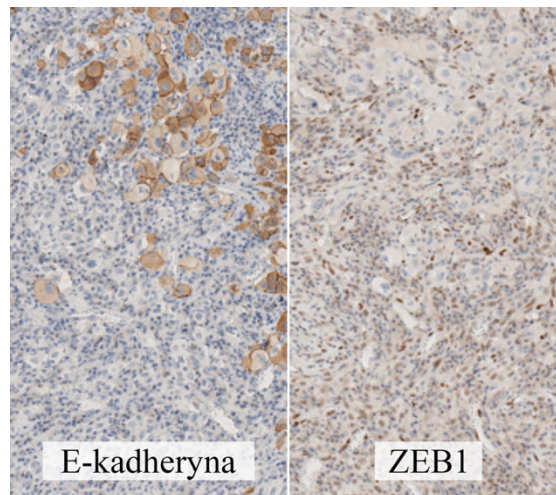
Badania molekularne innych autorów wskazują, że ZEB1 odgrywa kluczową rolę w procesie EMT w raku płuca, przez co wpływa na procesy inwazji i przerzutowania, na mikrośrodowisko guza, ekspresję ujemnych punktów kontroli immunologicznej, jak również

wpływa na oporność na leczenie inhibitorami kinazy tyrozynowej (55), (65), (72), (73), (77), (78).

Istnieje ograniczona liczba publikacji nt. ekspresji immunohistochemicznej ZEB1 w rakach mięsakowatych płuca. W badaniu Matsubara i wsp. w raku wielopostaciowym płuca, ZEB1 występował częściej niż raku gruczołowym i płaskonabłonkowym (odpowiednio 50%, 0%, 10%), a jego ekspresja była wyższa w polach o niskiej lub negatywnej ekspresji E-kadheryny (74). Wysoka ekspresja ZEB1 była związana z niższą częstością inwazji naczyń krwionośnych, a niższa ekspresja E-kadheryny korelowała z wielkością guza i wyższym stopniem zaawansowania. Niestety badana grupa raków wielopostaciowych była bardzo mała - 10 przypadków - co nie pozwala na wyciąganie wniosków, czy ZEB1 może być czynnikiem prognostycznym (74). Miyahara i wsp. badając grupę 42 chorych z rakiem wielopostaciowym płuca stwierdzili wysoką ekspresję ZEB1 ($\geq 75\%$ komórek) w 29% przypadków, która była czynnikiem prognostycznym (75).

W prezentowanym badaniu ekspresję wimentyny obserwowano w 86% przypadkach w komponentcie mięsakowatym i w 58% w komponentcie nabłonkowym. Natomiast ekspresja E-kadheryny była wyraźnie słabsza i rzadsza w komponentcie mięsakowatym niż nabłonkowym (odpowiednio 30% vs 94% przypadków), co wskazuje wyraźnie na obecność przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej w badanych guzach. Dodatnią reakcję z przeciwciałem ZEB1 stwierdzono w 55% przypadków, a w 36% przypadków reakcja była silnie wyrażona (≥ 8), przy czym, poza 3 przypadkami, ekspresja była wyłącznie w komponentcie mięsakowatym. Fakt, że ekspresję ZEB1 stwierdzono jedynie w połowie przypadków, może wskazywać na aktywację procesów EMT inną ścieżką sygnałową, jak sugerują niektórzy autorzy, być może związaną z nadmierną ekspresją c-Jun i nadekspresją wimentyny i faszyny (28), (92).

Wykazano wyraźną ujemną korelację pomiędzy dodatnią ekspresją ZEB1 a ujemną E-kadheryny w utkaniu mięsakowatym (fot. 25). Jedynie w 3 przypadkach obserwowano koekspresję tych markerów, ale obie reakcje były słabe. Wyniki te korelują z wynikami badań innych autorów (73), (74) oraz znajdują wytłumaczenie w wynikach badań molekularnych (70), (71), (72).



Fot. 25 Ujemna korelacja ekspresji E-kadheryny i ZEB1: dodatnia ekspresja E-kadheryny w komponentie nabłonkowym i ujemna w mięsakowatym oraz odwrotna reakcja z ZEB1. Badanie IHC: E-kadheryna, ZEB1, pow. x200

Jak wspomniano wyżej, w omówieniu wyników badań immunohistochemicznych, ujemną reakcję z przeciwciałem ZEB1 obserwowano w grupie raków bez ekspresji wimentyny w utkaniu mięsakowatym, co świadczy o braku cech EMT w tych guzach. Co ciekawe, ekspresja ZEB1 w grupie raków bez wyraźnego komponentu nabłonkowego była podobnie częsta jak w guzach z obecnością tego utkania. Typ utkania histologicznego komponentu nabłonkowego i mięsakowatego nie miał istotnego związku z ekspresją ZEB1, chociaż najczęściej dodatnia ekspresja występowała w utkaniu olbrzymiokomórkowym (71%).

Przeciwnie do innych autorów (73), (74), nie stwierdzono, aby ekspresja ZEB1 i E-kadheryny miała związek ze stopniem zaawansowania, rozległością martwicy, naciekaniem opłucnej, inwazją naczyń limfatycznych i krwionośnych ($p > 0,05$). Stwierdzono natomiast, że cecha pN0 występowała znacznie rzadziej w guzach z dodatnią reakcją z ZEB1 ($p = 0,033$). Porównując guzy o różnym stopniu zaawansowania zauważono, że w stopniu zaawansowania I dodatnia ekspresja ZEB1 była dwukrotnie częstsza niż ujemna (12 vs 6 przypadków), a w zmianach w II i III/IV stopniu zaawansowania stosunek ten wynosił odpowiednio ok. 1,4:1 i 1:1. Odwrotną korelację stwierdzono dla E-kadheryny. Może to pośrednio potwierdzać tezę, że procesy rozbieżnego różnicowania histologicznego w raku wielopostaciowym, zależne od EMT, rozpoczynają się na wczesnym etapie jego rozwoju (72).

W prezentowanym badaniu nie wykazano związku między ekspresją markerów EMT a ekspresją PD-L1 oraz zjawiskiem szerzenia się raka przestrzeniami powietrznymi (STAS).

W niektórych doniesieniach badania molekularne procesów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej w rakach płuca wskazywały na silny wpływ EMT na wielkość guza, stopień zaawansowania, angiogenezę, tworzenie przerzutów oraz gorsze przeżycie wolne od choroby i przeżycie całkowite (5), (65), (73), (77). W innych pracach status EMT nie był czynnikiem prognostycznym OS i DFS w NSCLC (78), (79). W cytowanym wcześniej badaniu Liu i wsp., obejmującym raki mięsakowate płuca, dodatnia ekspresja immunohistochemiczna TWIST1 i przerzuty były niezależnymi czynnikami ryzyka gorszego przeżycia całkowitego (67). W badaniu Miyahara i wsp., w jedno- i wielowariantowej analizie statystycznej, wysoka ekspresja ZEB1 była predyktorem gorszego przeżycia wolnego od nawrotu i przeżycia całkowitego zależnego od choroby (75).

W prezentowanej pracy nie stwierdzono istotnych różnic w przeżyciu całkowitym oraz przeżyciu wolnym od choroby w zależności od ekspresji E-kadheryny, wimentyny oraz ZEB1 ani od stopnia nasilenia reakcji z ZEB1 ($p>0,05$).

Różnice w uzyskanych wynikach mogą być związane, przynajmniej częściowo, z technicznymi aspektami wykonania reakcji immunohistochemicznej z przeciwciałem ZEB1, m.in. z zastosowanym klonem i stężeniem, które w każdej z cytowanych prac były odmienne. Przeciwciało to nie jest stosowane w codziennej praktyce i nie ma gotowych, zwalidowanych protokołów badania. Dostępne piśmiennictwo oparte jest głównie na przypadkach raków innych narządów. Opracowanie protokołu barwienia, określenie odpowiedniego stężenia, warunków reakcji i kryteriów oceny, było bardzo czasochłonnym i wymagającym etapem badania. Pomimo to uzyskane wyniki ilościowe wydają się zbieżne z podanymi w piśmiennictwie, co wskazuje, że przyjęte zasady wykonania i oceny badania immunohistochemicznego były podobne, a różnice w wynikach mają inne źródło. Przyczyną może być odmienna liczebność badanych grup. W prezentowanej pracy przeanalizowano 107 przypadków, w tym 100 raków wielopostaciowych, 5 olbrzymiokomórkowych oraz 2 wrzecionowatokomórkowe, w porównaniu do znacznie mniejszej liczby guzów w cytowanych pracach (9), (67), (75), w których badano 10, 41 i 42 przypadki raków. Dodatkowo jedna z prac obejmowała przypadki mięsakoraka, który ma inne cechy kliniczno-patologiczne i przebieg kliniczny (67).

6.3 Ekspresja PD-L1

Opracowanie metod leczenia opartych na stosowaniu inhibitorów punktów kontroli immunologicznej stało się w ostatnich latach szansą dla pacjentów z zaawansowanym NSCLC, w tym dla chorych z rakiem wielopostaciowym.

Velcheti i wsp. po raz pierwszy zwrócili uwagę na wysoką częstość występowania ekspresji PD-L1 na komórkach raków mięsakowatych płuc, wyższą niż w innych postaciach NSCLC, odpowiednio 69,2% vs 27,4% (48). Podobnie w badaniach innych autorów ekspresja PD-L1, oceniana metodą immunohistochemiczną na komórkach raków mięsakowatych, w tym raka wielopostaciowego, była wysoka i wahała się od ok. 50 do 90%, w zależności od przyjętych kryteriów reakcji dodatniej i badanej populacji (38), (47), (49), (50), (52), (53), (54), (84). Jedynie w badaniu Lococco i wsp. oraz Yang i wsp. częstość dodatniej reakcji z PD-L1 wynosiła odpowiednio 25,5% i 36,5%, co mogło być związane z klonem przeciwciała (28-8) oraz, w przypadku Yanga, z wykorzystaniem mikroskrawków, a nie pełnych preparatów (51), (93).

W przedstawianej pracy dodatni odczyn z przeciwciałem PD-L1 obserwowano w 64% przypadków, w tym w 66% odczyn był silny - dotyczył 50% i więcej komórek raka. Częstość dodatniej reakcji była nieznamiennie statystycznie wyższa w materiałach z ostatnich 10 lat w stosunku do materiałów starszych niż 15 lat - odpowiednio 74% vs 42% ($p=0,056$). Być może różnice w ekspresji PD-L1, związane z wiekiem blozków parafinowych, były spowodowane degradacją materiału tkankowego lub zmianami technologicznymi w obróbce materiału w badanym okresie 2000-2019r. Badania innych autorów obejmowały krótsze okresy - od 7 do 18 lat - i nie publikowano takich obserwacji.

Aspekty techniczne i sposób interpretacji wyników są przyczyną trudności w porównywaniu wyników różnych badań, a być może, częściowo również źródłem rozbieżności w analizowaniu uzyskanych danych. Zastosowanie różnych przeciwciał, zestawów detekcyjnych i aparatury ma wpływ na wynik reakcji barwnej z przeciwciałem. Natomiast sposób interpretacji wyników związany jest z różnym odsetkiem komórek nowotworowych uznawanym za wynik dodatni, trudnościami w ocenie reakcji immunohistochemicznej, heterogennością guza, doświadczeniem oceniającego oraz oceną reakcji w nacieku zapalnym, a nie w komórkach nowotworowych.

Niektórzy autorzy podkreślają, że na ekspresję PD-L1 mają również wpływ czynniki genetyczne, epigenetyczne i mikrośrodowiskowe (93), (94). Może to wyjaśniać szczególnie wysoki odsetek (ok. 90%) dodatniej ekspresji PD-L1 na komórkach raków mięsakowatych w pracach autorów koreańskich i japońskich (38), (49), (84). W tabeli 54 przedstawiono porównanie metod i wyników badań różnych zespołów. Rosnąca liczba badań dotycząca punktów kontroli immunologicznej i ich znaczenia w biologii NSCLC pozwoliła na ustalenie kryteriów, które przyjęto w bieżącym badaniu.

W omawianej pracy, podobnie jak inni autorzy, obserwowano wyższą ekspresję PD-L1 w komponente raka gruczołowego niż raka płaskonabłonkowego (38), (50), (51), (52), ale najczęściej pojawiała się w raku wielkomórkowym (100% przypadków). W odróżnieniu od prac niektórych autorów (47), (49), nie zanotowano różnic w częstości i nasileniu ekspresji pomiędzy komponentem nabłonkowym i mięsakowatym. Również typ komponentu mięsakowatego nie miał związku z ekspresją PD-L1.

W prezentowanym badaniu dodatni odczyn PD-L1 był znamienne częściej silnie dodatni w guzach z intensywnym naciekiem zapalnym. W raku wielopostaciowym bardzo często obserwuje się mniej lub bardziej intensywny naciek z komórek limfo-plazmatycznych lub neutrofili co wskazuje na istnienie lokalnej odpowiedzi immunologicznej na komórki guza i powinno wpływać na ograniczenie wzrostu nowotworu. Część autorów uważa, że częsta obecność na komórkach raka wielopostaciowego ligandu aktywującego cząsteczkę PD-1 limfocytów, prowadzi do supresji i apoptozy limfocytów T, co sprzyja progresji i może tłumaczyć bardziej agresywny przebieg kliniczny choroby (45), (47), (48).

Tabela 54. Porównanie wyników badań ekspresji PD-L1 w rakach mięsakiowatych płuc różnych autorów

Autor, rok publikacji (okres objęty badaniem)	Liczba przypadków	Podtypy histologiczne	Odsetek dodatnich wyników PD-L1	Klon PD-L1	Metoda badania, typ reakcji, przyjęty punkt odcięcia	Główne wnioski i wartość prognostyczna (WP)
Velcheti i wsp. (48), 2013 (1988-2003)	13	PSC (1 PC, 10 GC, 1 CS)	69,2%	5H1	automatyczna ilościowa analiza immunofluorescencyjna, mikroskrawki, punkt odcięcia - nie podano	Ekspresja PD-L1 częstsza i ok. 40% wyższa w PSC niż w NSCLC (27,4%). WP - nie badano.
Kim i wsp. (49), 2015 (2002-2013)	41	PC	90,2%	E1L3N	mikroskrawki, r. błonowa i cytoplazmatyczna, skala punktowa $\geq 10\%$, wysoka ekspresja 50% (większość)	Częstsza ekspresja w AC niż innych podtypach, w komponencie S niż E (87,5% vs 67,5%). WP - brak związku z OS, tendencja do gorszego DFS, ($p>0,05$).
Chang i wsp. (47), 2016 (1996-2015)	122	PC	70,5%	CD274	prawdopodobnie całe skrawki, $\geq 5\%$, r. błonowa	Związek z martwicą i ekspresją HIF-1 α . WP - wysoka ekspresja niezależnym czynnikiem ryzyka gorszego OS.
Veira i wsp. (50), 2016 (1997-2013)	75	PSC (59 PC, 9 CS, 4 GC, 1 SC)	53%	B7H1	mikroskrawki, $\geq 5\%$	Częstsza ekspresja w guzach TTF-1(+) niż p63(+), częstsza BVI i częsta mutacja KRAS, brak związku z wiekiem, wielkością guza, TNM, LVI. WP - brak związku z OS.
Lococco i wsp. (51), 2016 (2005-2015)	43	PSC	25,5%	28-8	pełne skrawki, $\geq 10\%$, (ale 40% przypadków $\geq 1\%-9\%$)	Częsta korelacja mutacji KRAS. WP - gorsza prognoza, ale związek z OS i DFS nie był statystycznie znaczący.
Yvarel i wsp. (52), 2017 (1997-2016)	36	PSC (31 PC, 5 SC/GC)	75%	E1L3N	pełne skrawki, $\geq 5\%$, r. błonowa, wysoka ekspresja 50% (16% przypadków)	Częstsza ekspresja w guzach TTF-1(+) niż p63(+), brak związku z wiekiem, płcią, TNM, inwazją oplotu i typem histologicznym. WP - negatywny związek z OS.
Imanishi i wsp. (53), 2018 (2001-2012)	26	PC	76,9%	E1L3N	pełne skrawki, $\geq 1\%$	WP - ekspresja $\geq 15\%$ związana z lepszym OS i lepszym przeżyciem specyficznym dla raka (ang. <i>cancer specific survival</i>)
Yang i wsp. (93), 2019 (2008-2016)	148	PSC	36,5%	28-8	mikroskrawki, $\geq 1\%$	Częsta koekspresja PD-L1/CD47 (24,3%). WP - koekspresja PD-L1/CD47 związana z gorszym OS.
Naito i wsp. (38), 2019 (2002-2016)	35	PC	91,4%	22C3	pełne skrawki, $\geq 1\%$, wysoka ekspresja 50% (60%), r. błonowa	Częściej inwazja oplotu. WP - tendencja do gorszego DFS, brak związku z OS.
Ağaçkiran i wsp. (54), 2020 (2011-2018)	65	PSC (51 PC, 8 GC/SC, 6 CS)	72,3%	SP-263	pełne skrawki, $\geq 25\%$, r. błonowa i cytoplazmatyczna, wysoka ekspresja $\geq 50\%$ (98% przypadków)	Częściej inwazja oplotu i cecha N+. WP - brak związku z OS.
Prezentowana praca (2000-2019)	107	100 PC, 5 GC, 2 SC	64%	22C3	pełne skrawki, $\geq 1\%$, r. błonowa, wysoka ekspresja $\geq 50\%$ (66% przypadków)	Wysoka ekspresja związana z martwicą $\geq 50\%$ i nasilonym naciekiem zapalnym, brak związku z wielkością guza, stopniem zaawansowania, LVI, BVI, ekspresją markerów EMT. WP - brak związku z OS i DFS.

PSC - raki mięsakiowate płuca; PC - rak wielopostaciowy; GC - rak olbrzymiokomórkowy; SC - rak wrzcionowatokomórkowy; CS - mięsakorak

Istnieją dwie teorie tłumaczące obecność białka PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych. Teoria wrodzonej ekspresji tej cząsteczki zakłada obecność konstytutywnego genu PD-L1 w jądrze komórki nowotworowej i jego indukcję przez onkogenne sygnały transkrypcyjne. Natomiast druga uznaje adaptacyjną ekspresję PD-L1 na komórkach nowotworowych w odpowiedzi na różnorodne czynniki stymulujące, przede wszystkim zapalne (45). Wykazano, że również niedotlenienie jest czynnikiem powodującym szybką i gwałtownie zwiększoną ekspresję PD-L1 zależną głównie od czynnika HIF-1 α . Chang i wsp. stwierdzili, że wysoka ekspresja PD-L1 była związana z ekspresją HIF-1 α i martwicą, co według nich wskazuje, że mechanizm niedotlenienia jest główną przyczyną wystąpienia ekspresji PD-L1 (47).

W przedstawianej pracy dodatni odczyn PD-L1 był znamienne częściej silnie dodatni w guzach z rozległą martwicą obejmującą $\geq 50\%$ powierzchni guza ($p=0,023$), co może potwierdzać tę teorię.

Uważa się, że niedotlenienie indukuje również procesy transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej, które odgrywają istotną rolę w powstawaniu raka wielopostaciowego (47). Chen i wsp. wykazali, że proces transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej w grupie raków gruczołowych płuca jest związany z supresją limfocytów T CD8 $^{+}$ i zwiększoną ekspresją PD-L1, a aktywatory procesu EMT, takie jak ZEB1, mogą mieć wpływ na poziom ekspresji PD-L1 (55). W raku płaskonabłonkowym głowy i szyi Ock i wsp. wykazali związek pomiędzy wysoką ekspresją PD-L1 a obecnością markerów transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT), badanej jako dodatnia reakcja z wimentyną i ujemna z E-kadheryną. Dodatkowo pacjenci PD-L1 $^{+}$ /EMT $^{+}$ mieli gorsze całkowite przeżycie i przeżycie wolne od progresji niż chorzy PD-L1 $^{+}$ /EMT $^{-}$ (76). W innych NSCLC ekspresja PD-L1 również korelowała z przewagą markerów podścieliskowych niż nabłonkowych (56).

W prezentowanym badaniu liczba przypadków z dodatnią ekspresją wimentyny i dodatnią ekspresją PD-L1 była wyższa niż w cytowanych badaniach obejmujących inne postacie NSCLC, ale nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji PD-L1 pomiędzy grupami immunohistochemicznymi wydzielonymi w zależności od ekspresji wimentyny w komponencie nabłonkowym i mięsakowatym, w tym od grupy nie wykazującej w ogóle dodatniej reakcji z wimentyną ($p=0,401$). Ekspresja PD-L1 nie miała statystycznego związku z ujemną ekspresją E-kadheryny oraz z dodatnią ekspresją ZEB-1 w komórkach raka ($p=0,098$ i $p=0,161$).

Podobnie jak u innych autorów, w prezentowanym materiale nie stwierdzono korelacji pomiędzy dodatnią ekspresją PD-L a obecnością zatorów w naczyniach limfatycznych i krwionośnych oraz stopniem zaawansowania klinicznego choroby (50), (52). W odróżnieniu od innych prac, nie obserwowano częstszego występowania naciekania opłucnej i przerzutów w węzłach chłonnych (38), (51), (54).

W związku z niewielką liczbą badań znaczenie prognostyczne ekspresji PD-L1 w raku wielopostaciowym i innych rakach mięsakowatych pozostaje niejednoznaczne. W większości prac nie stwierdzono znamienego statystycznie związku z OS i DFS lub PFS, chociaż niektórzy badacze zauważyli tendencję do gorszego rokowania (38), (49), (50), (51), (54). W dwóch badaniach wykazano, że wysoka ekspresja PD-L1 była związana z gorszym OS (47), (52). Jedynie wg Imanishi i wsp. ekspresja PD-L1 $\geq 15\%$ była związana z lepszym przeżyciem całkowitym oraz przeżyciem specyficznym dla raka. Badanie to obejmowało jednak niewielką grupę pacjentów z rakiem wielopostaciowym (26 przypadków), a wyniki nie zostały potwierdzone w innych badaniach (52).

W prezentowanej pracy nie zaobserwowano różnic w przeżyciu całkowitym (OS) oraz w przeżyciu wolnym od choroby (DFS) w zależności od ekspresji PD-L1 ($p > 0,05$). Jednak w analizie dwuczynnikowej obejmującej ekspresję PD-L1 i rozległość martwicy, przeżycie wolne od choroby w grupie z dodatnią ekspresją PD-L1 i martwicą obejmującą $> 25\%$ guza było najkrótsze (mediana 0,7 lat) oraz istotnie gorsze w stosunku do guzów z martwicą $\leq 25\%$ i ujemną ekspresją (mediana 8,3 lata) ($p = 0,023$). Może to być istotnym dodatkowym czynnikiem wyodrębniającym grupę chorych z wyższym ryzykiem nawrotu choroby, która wymagałaby systematycznych badań kontrolnych, w celu wczesnego wykrycia przerzutów lub wznowy choroby i szybkiego wdrożenia terapii lekami blokującymi punkty kontroli immunologicznej.

6.4 Szerzenie się raka przestrzeniami powietrznymi (STAS)

Szerzenie się raka płuca (inwazja) jest definiowane jako naciekanie podścieliska z desmoplazją i proliferacją miofibroblastów, naciekanie naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz opłucnej, typ wzrostu inny niż tapetujący. W roku 2015 klasyfikacja WHO nowotworów płuca wprowadziła nowy typ rozprzestrzeniania się raka płuca przestrzeniami powietrznymi nazwany STAS (ang. *spread through air spaces*) (11).

Obecność komórek nowotworowych w drogach powietrznych w niektórych typach raka była opisywana już wcześniej, jednak dopiero Onozato i wsp. w 2013r. opisali tzw. wyspy nowotworowe (ang. *tumor islands*, TI) i wykazali, stosując modelowanie 3D, że wyspy są powiązane wielopoziomowo ze sobą i z główną masą guza (95). Na tej podstawie wysunęli przypuszczenie, że może to być specyficzny sposób szerzenia się raka. Chorzy z obecnością TI mieli gorsze 5-letnie przeżycie wolne od nawrotu, bez względu na typ resekcji oraz prawie dwukrotnie większe ryzyko nawrotu.

Określenie STAS zostało wprowadzone przez Kadota i wsp. w 2015r. w pracy opartej na analizie 411 operacyjnych przypadków raka gruczołowego w I stopniu zaawansowania (60). Autorzy zdefiniowali STAS jako występowanie niezwiązanych ze ścianą pęcherzyka płucnego komórek raka w mięszu płuca, poza brzegiem guza, nawet jeśli jest to pierwsza przestrzeń pęcherzykowa. Wyodrębnili 3 typy morfologiczne STAS: drobnobrodawkowaty, lite gniazda i pojedyncze komórki. Mierzyli także odległość STAS od brzegu guza linią oraz liczbą przestrzeni pęcherzykowych. Zdaniem badaczy, luźno leżące komórki czy grupy komórek raka wypełniające przestrzenie powietrzne, niezwiązane ze sobą oraz z guzem, są manifestacją inwazji i szerzenia się raka wzdłuż naturalnej, specyficznej dla płuc przestrzeni, jaką jest światło pęcherzyków. Analiza statystyczna wykazała, że w grupie chorych leczonych ograniczoną resekcją obecność STAS była niezależnym i jedynym czynnikiem ryzyka nawrotów (miejscowych i odległych).

W tym samym roku została opublikowana praca Warth i wsp., w której przyjęto odmienną definicję wewnątrzpęcherzykowego szerzenia się raka gruczołowego oraz wprowadzono podział na ograniczony i rozległy STAS, w zależności od odległości komórek raka od głównej masy guza. Pomimo odmiennych założeń wyniki także wskazywały, że istnienie STAS związane jest z gorszym przeżyciem całkowitym oraz krótszym czasem przeżycia wolnego od nawrotów (58).

W kolejnych latach opublikowano wiele prac dotyczących występowania i znaczenia STAS w różnych typach raka płuca, w tym w raku wielopostaciowym (64).

Częstość występowania STAS w grupie NSCLC, wg ostatnio opublikowanych meta-analiz, wahała się w zakresie 14,8%-55,4% (96), (97). Yokoyama i wsp. badając grupę 35 pacjentów z rakiem wielopostaciowym płuca stwierdzili obecność STAS w 40% przypadków. Zmiany pojawiały się pod postacią pojedynczych komórek nowotworowych, drobnych grup

(wyjątkowo brodawkowatych) lub gniazd. Nie stwierdzili istotnej statystycznie korelacji z typem utkania nabłonkowego i mięsakowatego, podtypem utkania gruczołowego, stopniem zaawansowania patologicznego i klinicznego, inwazją opłucnej oraz naczyń. Nieco częściej obserwowali STAS w przypadkach z nasiloną martwicą ($p=0,094$) (64).

W przedstawianej pracy występowanie STAS było zbliżone i wynosiło 39%. Nieco częściej STAS stwierdzano w przypadkach z obecnością utkania gruczołowego, natomiast najrzadziej w przypadkach z utkaniem wrzecionowatokomórkowym ($p>0,05$). Równie często obserwowano grupy/drobne gniazda komórkowe jak i pojedyncze komórki, a najrzadziej struktury brodawkowe, przy czym stwierdzane struktury nie miały związku z typem histologicznym utkania. Podobnie jak w części prac dotyczących raków gruczołowych i płaskonabłonkowych (58), (59), (61), (62), STAS występował znamienne częściej u chorych z wyższym stopniem zaawansowania choroby, natomiast nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności z wielkością zmiany, obecnością inwazji naczyń i opłucnej oraz rozległością martwicy. Może to być związane z faktem, że wymienione cechy, uważane za prognostycznie niekorzystne, częściej występują w raku wielopostaciowym, stąd trudności w wykazaniu statystycznego związku.

Podjęmowane są także próby ustalenia wskaźników ilościowych oceny STAS, które byłyby pomocne w diagnostyce i stanowiły czynnik prognostyczny. Odległość ognisk STAS od brzegu zmiany mierzona linią oraz liczbą przestrzeni powietrznych okazała się czynnikiem nieistotnym (58), (61), (62). Uruga i wsp. zaproponowali podział STAS w zależności od liczby komórek/grup komórek raka stwierdzanych w pęcherzykach płucnych na niski (1-4 komórki lub grup, ls) i wysoki STAS (≥ 5 , hs) oraz wykazali, że może to być czynnik prognostyczny stratyfikujący pacjentów na grupy o różnym ryzyku wystąpienia wznowy i odmiennym rokowaniu (59).

W omawianej pracy obserwowano podobny jak u Uruga i wsp. rozkład przypadków z niskim i wysokim STAS, odpowiednio: 43,6% vs 38,4% oraz 56,4% vs 61,6%. Choć mediany DFS dla niskiego i wysokiego STAS nie różniły się znacząco, to przypadki z obecnością hs miały istotnie krótszy czas przeżycia wolnego od choroby w stosunku do pacjentów STAS(-), odpowiednio: 0,67 vs 3,98 lat ($p=0,006$). Nie wykazano różnic w przeżyciu całkowitym w zależności od kryterium ilościowego. Ponadto liczebność grup była zbyt mała do miarodajnej analizy statystycznej pod kątem danych kliniczno-patologicznych. Ustalenie ewentualnych kryteriów ilościowych wydaje się obiecującym kierunkiem, ale wymaga

dalszych prac na większych grupach pacjentów. Dla wielu patologów koncepcja, że nawet jedna komórka raka w pierwszej przestrzeni powietrznej przylegającej do guza może decydować o rozpoznaniu STAS i ewentualnym poszerzeniu resekcji lub leczeniu adjuwantowym, jest trudna do zaakceptowania.

Dane dotyczące znaczenia prognostycznego STAS są zróżnicowane w zależności od badanej grupy, typu raka i przyjętych kryteriów diagnostycznych. Cytowane wcześniej meta-analizy wskazują, że obecność STAS była związana z gorszym przeżyciem wolnym od nawrotów w przypadkach raków gruczołowych, płaskonabłonkowych i wielopostaciowych oraz gorszym przeżyciem całkowitym w raku gruczołowym, ale nie płaskonabłonkowym i wielopostaciowym (96), (97).

W badaniu Yokoyama i wsp. w przypadkach raka wielopostaciowego obecność STAS, w analizie jednoczynnikowej, była związana ze statystycznie gorszym przeżyciem całkowitym i wolnym od nawrotu, szczególnie w grupie o wyższym zaawansowaniu (III). W analizie wieloczynnikowej stopień zaawansowania, obecność martwicy i obecność STAS były istotnymi predyktorami OS i DFS, jednak badana grupa była niewielka (14/35 chorych) (64).

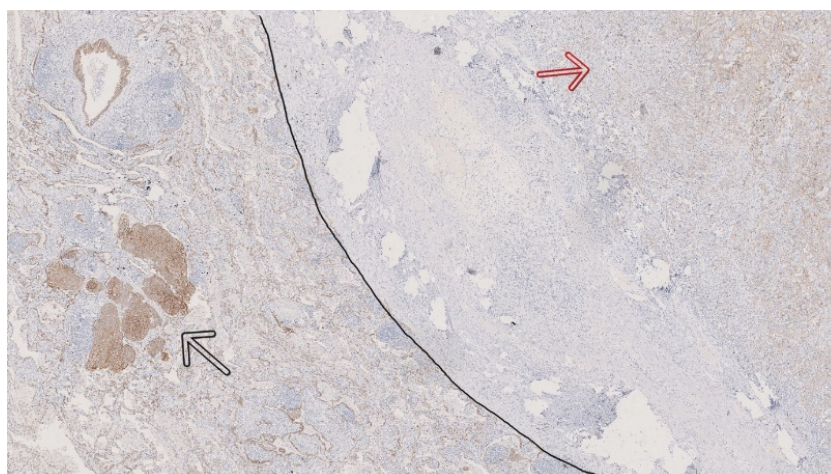
W omawianej pracy mediana przeżycia całkowitego chorych STAS(+) była niższa niż w grupie STAS(-) 1,43 vs 3,12 lat, ale różnica nie była statystycznie znamienna ($p=0,052$). W analizie wieloczynnikowej obecność STAS nie miała wpływu na OS, podobnie jak w pracach innych autorów (58), (60), (61), (95). Obecność STAS miała natomiast istotny związek z krótszym czasem przeżycia wolnego od choroby ($p=0,01$), co koreluje z wynikami innych autorów włączonych do opublikowanych meta-analiz (96), (97). W analizie wieloczynnikowej wartość prognostyczna STAS dla DFS była zmienna w zależności od przyjętych w analizie parametrów, co może wskazywać, że jest to rzeczywiście ważny czynnik rokowniczy, ale raczej w korelacji z innymi cechami guza.

Wiele prac dotyczących raka gruczołowego wykazało, że obecność STAS jest czynnikiem ryzyka nawrotów w przypadku ograniczonej resekcji guza i w zmianach wczesnych (60), (62), (98). W przedstawianym badaniu tylko u jednego pacjenta wykonano miejscową resekcję guza, a pozostali chorzy poddani byli rozległym zabiegom chirurgicznym. Dodatkowo 52,5% chorych znajdowało się w III i IV stopniu zaawansowania. Uzyskane wyniki wskazują, że także u chorych po rozległej resekcji i z wyższym stopniem zaawansowania, STAS może

mieć znaczenie dla określenia ryzyka nawrotu choroby. Znaczenie prognostyczne STAS w przypadku raka wielopostaciowego wymaga jednak dalszych analiz, gdyż wnioski oparte na pojedynczych badaniach mogą nie być miarodajne.

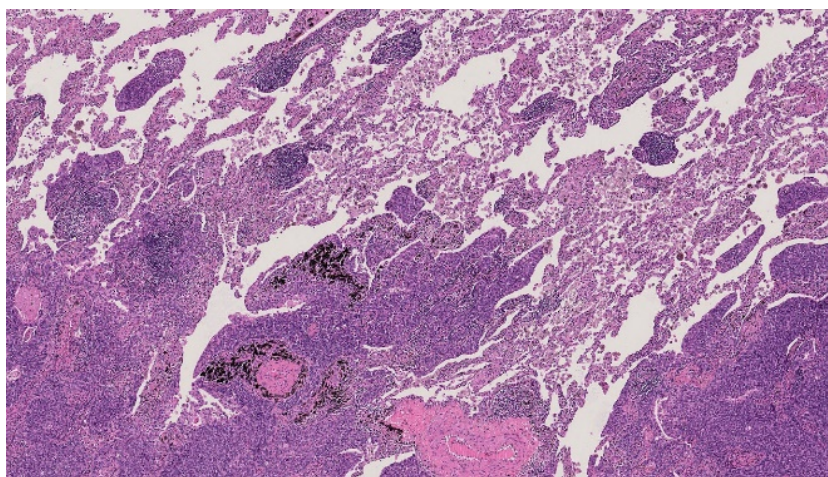
Pomimo dość licznych publikacji nadal istnieje wiele wątpliwości dotyczących kryteriów rozpoznawania STAS. W piśmiennictwie widoczne są rozbieżności w przyjętych zasadach oceny izolowanych komórek/grup raka w przestrzeniach powietrznych, co pokazuje, że praktyczne zastosowanie definicji zaproponowanej w klasyfikacji WHO jest czasami trudne. Część autorów włącza do oceny większe gniazda/wyspy komórkowe, które nie są ujęte w definicji WHO (61), (64), inni pomijają ogniska w pierwszej przestrzeni powietrznej chcąc uniknąć analizowania artefaktów (99) .

W prezentowanej pracy ocena mikroskopowa STAS również stwarzała wiele problemów dotyczących różnicowania STAS z artefaktami, złuszczonymi nabłonkami pęcherzyków płucnych, makrofagami i histiocytami oraz identyfikacji pojedynczych komórek, szczególnie w raku gruczołowym i olbrzymiokomórkowym. Znalezione wyspy/gniazda komórek nowotworowych (większe niż kilka komórek) kwalifikowano jako grupy (fot. 26).



Fot. 26 Wątpliwości diagnostyczne - STAS? TI? Większe ogniska raka (czarna strzałka) wyraźnie oddalone od brzegu guza, dodatkowo o odmiennej morfologii i ekspresji E-kadheryny niż guz (czerwona strzałka). Barwienie IHC: E-kadheryna, pow. x25

Ustalenie granicy guza często było trudne, szczególnie, że w większości przypadków (94%) brzeg guza był nierówny (fot. 27).



*Fot. 27 Nierówny brzeg guza, granica trudna do jednoznacznego określenia.
Barwienie HE, pow. x50*

Niektórzy autorzy wskazują, że badania immunohistochemiczne mogą pomóc w identyfikacji komórek raka w przestrzeniach powietrznych (100). W prezentowanej pracy, badania immunohistochemiczne rzadko były pomocne, ze względu na nakładanie się ekspresji cytokeratyny, wimentyny oraz TTF1 w komórkach raka wielopostaciowego oraz w komórkach prawidłowych. Jedynie w przypadkach większych grup komórek reakcje te były diagnostyczne (fot. 28). Ponadto zastosowanie panelu przeciwciał przy tak drobnych zmianach, lub nawet pojedynczych komórkach, jest często niemożliwe, gdyż w kolejnych skrojeniach są one już nieobecne. Podobną opinię wyrażają też inni autorzy (59), (64).



Fot. 28 STAS. Podobna ekspresja E-kadheryny w komponentcie olbrzymiokomórkowym i w grupach komórek poza brzegiem guza (linie zielone) bywa pomocna w rozpoznaniu STAS. Barwienie IHC: E-kadheryna, pow. x25

Problemy związane z pozyskaniem powtarzalnego materiału utrudniają badania nad mechanizmami odpowiedzialnymi za szerzenie się komórek w przestrzeniach powietrznych. Otwarte pozostaje pytanie - jak długo komórki raka mogą przeżyć w pęcherzykach powietrznych, w oderwaniu od głównej masy guza i od zaopatrzenia drogą naczyń krwionośnych, gdy wiadomo, że w kulturach komórkowych w warunkach głodu, średni czas przeżycia wynosi ok. 12h (101), a odległość od naczyń powyżej 100µm powoduje apoptozę (102). Nie wiadomo jakie mechanizmy komórkowe i biologiczne miałyby odpowiadać za ten typ rozprzestrzeniania się nowotworu.

Wydaje się, że mechanizmy transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej, odpowiedzialne za progresję nowotworów i plastyczność komórkową, mogłyby odgrywać istotną rolę w procesie szerzenia się drogami powietrznymi, podobnie jak w innych, klasycznych typach inwazji. Gdyby szerzenie się drogą powietrzną było „świadomą”, a nie przypadkową strategią progresji nowotworu, jego komórki powinny wykazywać cechy pozwalające im na przeżycie w nieznanym środowisku. W dostępnym piśmiennictwie znaleziono jedynie dwie prace, w których badano białka związane z EMT w przypadkach istnienia STAS. Liu i wsp. wykazali związek pomiędzy wysoką ekspresją białka towarzyszącego przerzutom 1 (ang. *metastasis-associated protein 1*, MTA1) w komórkach podścieliska raka gruczołowego płuca a większą częstością STAS (99). STAS stwierdzono w 51,4% przypadków, z czego połowa miała wysoką ekspresję MTA1. Chorzy ci, mieli gorsze czasy przeżycia całkowitego i wolnego od choroby niż pozostałe grupy pacjentów ($p < 0,001$). MTA1 jest jednym z białek włączonych w procesy EMT i wpływa na zmniejszenie ekspresji E-kadheryny. Według autorów, ekspresja MTA1 może być dodatkowym czynnikiem prognostycznym w grupie chorych STAS(+). Kadota i wsp. analizowali istnienie zależności pomiędzy obecnością STAS a ekspresją E-kadheryny i wimentyny w komórkach raka płaskonabłonkowego i nie wykazali istotnego statystycznie związku, chociaż STAS występował częściej w guzach z ekspresją wimentyny (62).

W prezentowanej pracy STAS występował częściej w guzach z ekspresją wimentyny, ale była ona częsta w całej badanej grupie raków. Analiza statystyczna nie wykazała związku ekspresji ZEB1 i E-kadheryny z obecnością STAS ($p > 0,05$). Ze względu na wysoką ekspresję wimentyny w raku wielopostaciowym można byłoby spodziewać się wysokiej częstości STAS, ale zarówno w omawianym badaniu, jak i w pracy Yokoyama i wsp. nie było to szczególnie częste zjawisko (64). Powyższe wyniki mogą świadczyć o tym, że przemiana nabłonkowo-

mezenchymalna nie jest istotnym elementem powstawania izolowanych komórek/grup szerzących się przestrzeniami powietrznymi.

Największymi oponentami wprowadzenia pojęcia STAS byli Thunnissen i Blaauwgeers oraz wsp., którzy utrzymywali, że w większości przypadków komórki raka w przestrzeniach pęcherzykowych związane są z procedurami operacyjnymi i traumatyzacją guza w czasie operacji, a także z opracowaniem patomorfologicznym materiału. Zjawisko to określili mianem: szerzenia się wzdłuż powierzchni noża (ang. *spreading through a knife surface*, STAKS). Dokonali oni przeglądu różnych typów artefaktów występujących w materiale z operacji miąższu płuca (103), przeprowadzili prospektywne wielośrodkowe badania materiału operacyjnego z niedrobnokomórkowymi rakami płuca (104) oraz dokonali przeglądu opublikowanych prac (102). Wykazali dużą rozbieżność w kryteriach kliniczno-patologicznych i wynikach różnych autorów oraz przedstawili model powstawania wolnych wpływających fragmentów raka, które są jedynie zanieczyszczeniami i nie powinny być - według nich - interpretowane jako inwazyjne elementy wpływające na rokowanie i postępowanie z pacjentem.

Inni autorzy zwracają uwagę na powtarzalność uzyskiwanych wyników i wskazują, że trudno wyjaśnić obserwowane znaczenie prognostyczne STAS wyłącznie artefaktami (96), (100), (101). Sugerują, że nie jest istotne jaka jest wyjściowa przyczyna powstawania izolowanych komórek w przestrzeniach powietrznych, ale sam fakt, że ich obecność w materiale pooperacyjnym może mieć związek z gorszym rokowaniem.

Zjawisko szerzenia się raka przestrzeniami powietrznymi wymaga dalszych badań wyjaśniających przyczyny i mechanizmy jego powstawania. Ponadto definicja zaproponowana w klasyfikacji WHO nowotworów klatki piersiowej wymaga dopracowania z ustaleniem precyzyjnych kryteriów różnicowania STAS od artefaktów, określeniem znaczenia i związku wysp/gniazd komórkowych ze STAS. Konieczne jest również ujednolicenie nazewnictwa i standardu raportowania oraz opracowanie kryteriów postępowania z materiałem ocenianym w czasie badania śródoperacyjnego, które jest kluczowe dla określenia zakresu resekcji.

6.5 Całkowity czas przeżycia, przeżycie wolne od choroby i czynniki prognostyczne

W omawianej pracy mediana przeżycia całkowitego (OS) wyniosła 23 miesiące, a 5-letnie przeżycie ok. 41,6%, przy średnim czasie obserwacji ok. 7,5 lat. Mediana przeżycia wolnego od choroby (DFS) sięgała 18,5 miesiąca, a 5-letnie przeżycie 35,8%, przy średnim czasie obserwacji ok. 7,8lat. W prezentowanym badaniu zwraca uwagę długi DFS i wysoki wskaźnik 5-letniego przeżycia, w porównaniu z wynikami innych autorów, które przedstawiono zbiorczo w tabeli 55. Różnice mogą mieć związek z właściwą kwalifikacją pacjentów do zabiegu operacyjnego, z zakresem wykonywanych operacji (dominowały lobektomie i bilobektomie) oraz doszczętnością leczenia chirurgicznego (90% zabiegów R0). Czas przeżycia całkowitego był krótszy w pracach obejmujących wszystkie typy raka mięsakowatego, w tym opartych na bazie SEER, ze względu na obecność w grupie mięsakoraka, który ma zdecydowanie gorsze rokowanie (8).

Tabela 55. Czas przeżycia całkowitego (OS), przeżycia wolnego od choroby (DFS) oraz czynniki prognostyczne w pracach różnych autorów. W zestawieniu uwzględniono jedynie prace, w których podano OS, DFS, 5-letni OS i analizę czynników prognostycznych, prace na bazach SEER oraz jedną pracę dotyczącą STAS w PC.

Autor (rok)	Liczba przypadków	Typ raka	Mediana OS [miesiące]	Mediana DFS [miesiące]	OS 5-letnie	Czynniki prognostyczne OS	Czynniki prognostyczne DFS
Sun (89) (2020)	SEER 1640	PSC	7		19,5%	<i>MV</i> - T4, N, PI, płeć	<i>MV</i> - N, M, leczenie
Sayan (20) (2020)	37	PSC (2 CS)	42	38	33,6%	<i>MV</i> - wielkość, cTNM	brak czynników istotnych
Manecil (6) (2017)	127	PSC	9,9	8,2	15%	<i>MV</i> - T, M, leczenie	
Yin (7) (2018)	SEER 309	PC	9		25,1%	<i>UV</i> , <i>MV</i> - wiek, T, M, leczenie	
Mochizuki (9) (2008)	70	PC	22,8	14,7	36,7%	<i>UVA</i> - St, N, LVI, Nm; <i>MV</i> - LVI, Nm	<i>UVA</i> - St, N, LVI; <i>MVA</i> - Nm
Vennisac (16) (2007)	39	PSC (bez CS)	11	4	33%	<i>UVA</i> , <i>MVA</i> - wielkość, wczesny nawrót	
Rahouma (8) (2018)	SEER 4987	PSC PC	6 35		15,5%	<i>MVA</i> - wiek, płeć, CS, T, N, leczenie	
Yokoyama (64) (2018)	35	PC	35	28	65,5%	<i>UVA</i> - St, Nm, STAS; <i>MVA</i> - St, STAS	<i>UVA</i> - St, Nm, STAS; <i>MVA</i> - Nm, STAS
Prezentowana praca (2021)	107	PC	23	18,5	41,2%	<i>UVA</i> - St, LVI, BVI, typ AC/SCC; <i>MVA</i> - St, typ AC/SCC	<i>UVA</i> - St, Nm, LVI, STAS, hs; <i>MVA</i> - Nm, typ AC w stosunku do SCC

Skróty: UVA - analiza jednoczynnikowa; MVA - analiza wieloczynnikowa; PI - inwazja oplotowej; St - stopień zaawansowania choroby; Nm - nasiloną martwica >25%.

W roku 2020 Krajowy Rejestr Nowotworów opublikował raport dotyczący raków płuca diagnozowanych w Polsce w latach 2014-2016 (106). Tabela 56 przedstawia porównanie przeżyć z bieżącego badania i danych KRN, dotyczących wszystkich raków płuca, leczonych radykalnie. Dane te nie mogą być porównywane wprost, gdyż dotyczą nieco innych grup pacjentów, ale ponieważ zdecydowaną większość pacjentów z rakiem płuca leczonych radykalnie stanowią chorzy z NSCLC, a liczba raków mięsakowatych zarejestrowanych w Rejestrze była niewielka (180 przypadków w okresie 2000-2017), mogą one stanowić pewne odniesienie do prezentowanego badania.

Tabela 56. Porównanie przeżycia 1- i 3-letniego względnego z badania bieżącego z danymi z KRN za okres 2014-2016

Typ	Przeżycie względne - metoda Hakulinena [lata]		
	1	3	5
Prezentowana praca	69,73%	49,87%	48,00%
KRN - chorzy leczeni radykalnie	75,00%	47,00%	brak danych

Względne przeżycia 1- i 3-letnie w badanej grupie pacjentów były zbliżone do wyników leczenia radykalnego raków płuca w Polsce, co może wskazywać, że rokowanie w operacyjnych rakach mięsakowatych płuc nie jest gorsze od innych raków. Niestety, dane w KRN dotyczące raka wielopostaciowego i innych raków mięsakowatych są niekompletne, co utrudnia analizę porównawczą. Yin i wsp. w oparciu o bazę SEER również nie wykazali różnic w przeżyciu całkowitym między rakiem wielopostaciowym a innymi NSCLC (7). Przeciwnie wyniki przedstawił Martin i wsp., którzy porównywali raki mięsakowate płuc z niemięsakowatymi NSCLC, łącząc zmiany o podobnych cechach klinicznych. Stwierdzili wyraźne różnice pomiędzy rakami mięsakowatymi i innymi postaciami NSCLC w medianie przeżycia całkowitego: 17,4 vs 79,1 miesiące, przeżyciu 5-letnim: 24,5% vs 46,3% i w czasie wolnym od nawrotu: 11,3 vs 61,4 miesiące (15).

Dane dotyczące czynników prognostycznych analizowanych w większości prac są zróżnicowane (tabela 55) i zależą od liczebności badanej grupy, przyjętych parametrów i zastosowanych metod statystycznych. Cechy od dawna uważane za istotne prognostycznie takie jak: wielkość zmiany, cecha T, N i M oraz - związany z nimi - stopień zaawansowania, powtarzają się w wielu badaniach zarówno w analizie jednoczynnikowej jak i wieloczynni-

kowej, co potwierdza ich znaczenie zarówno dla OS i DFS. Część autorów zwraca uwagę na prognostyczną rolę rozległości martwicy (9), (17), (64).

Jest to częściowo zbieżne z wynikami prezentowanej pracy, w której martwica zajmująca > 25% była niezależnym predyktorem gorszego czasu przeżycia wolnego od choroby (HR=3,551; 95%CI, 1,276-9,882; p=0,015). Co ciekawe, nie wykazano takiego związku dla martwicy > 50%, co wskazuje, że nawet stosunkowo niewielka ilość martwicy jest czynnikiem pogarszającym rokowanie. Jak wspomniano wcześniej, guzy z rozległą martwicą i dodatnią ekspresją PD-L1 miały najniższą medianę i 5-letnie przeżycie wolne od choroby (p=0,023), co może być pomocne przy planowaniu systematycznej kontroli nad pacjentem po operacji.

W przedstawianej pracy, w analizie jednoczynnikowej, istotnym czynnikiem prognostycznym dla OS i DFS była inwazja naczyń limfatycznych, a dla OS również inwazja naczyń krwionośnych, podobnie jak w badaniach innych autorów (9), (17), ale nie były one niezależnymi czynnikami rokowniczymi.

Znaczenie prognostyczne typu utkania histologicznego było badane jedynie w nielicznych pracach i nie miało istotnego związku z przeżyciem całkowitym i wolnym od nawrotów/progresji choroby (9), (12), (16), (24). Jedynie w jednej pracy utkanie inne niż płaskonabłonkowe korelowało z dłuższym przeżyciem całkowitym (17).

Interesujące jest, że w prezentowanym badaniu typ utkania nabłonkowego miał pewne znaczenie rokownicze. Zarówno w analizie jedno-, jak i wieloczynnikowej gorsze rokowanie co do OS występowało w grupie raków o mieszanym utkaniu gruczołowo-płaskonabłonkowym (HR=7,249; 95%CI, 1,986-26,458; p=0,003). Warto zauważyć, że był to typ histologiczny, w którym najczęściej występowała inwazja naczyń limfatycznych. Natomiast utkanie płaskonabłonkowe było niezależnym predyktorem lepszego rokowania co do czasu wolnego od nawrotu choroby, w stosunku do raka gruczołowego (HR:0,31, 95%CI 0,122-0,784; p=0,013).

W badanym materiale stwierdzono aktywację procesów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej odpowiedzialnych za agresywny przebieg i tworzenie przerzutów. Dlatego pewnym zaskoczeniem był brak istotnego związku markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej: wimentyny, E-kadheryny i ZEB1 z OS i DFS. Dodatkowo grupa, w której nie stwierdzono aktywacji EMT (ujemna ekspresja wimentyny i ZEB1, wysoka ekspresja

E-kadheryny w komórkach obu komponentów) okazała się niezależnym czynnikiem rokowniczym gorszego przeżycia wolnego od choroby (HR:4,888; CI95% 1,26-18,964; $p=0,022$). Na podstawie uzyskanych wyników, wydaje się, że ekspresja markerów EMT ma przede wszystkim znaczenie diagnostyczne, a nie rokownicze. Prace innych autorów wskazują, że w rakach mięsakowatych płuca może to być jednak dodatkowy czynnik prognostyczny (67), (75). Zbyt mała liczba prac nie pozwala na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków.

W prezentowanym badaniu wykazano, że szerzenie się raka przestrzeniami powietrznymi jest związane w gorszym czasem przeżycia wolnego od choroby ($p=0,01$), ale nie był to niezależny czynnik prognostyczny ($p=0,085$), jak omówiono w części poświęconej STAS. W pracy Yokoyama i wsp. (64), jedynej opisującej to zjawisko w raku wielopostaciowym, wystąpienie STAS było negatywnym czynnikiem rokowniczym DFS i OS, ale mediany przeżycia całkowitego i wolnego od choroby oraz przeżycia 5-letniego były stosunkowo wysokie w porównaniu do innych opublikowanych prac (tabela 55). Chen i wsp. w meta-analizie dotyczącej STAS zinterpretowali wyniki Yokoyamy i wsp. jako nieistotne dla OS (96), natomiast Liu i wsp. nie włączyli tej pracy do swojej meta-analizy (97).

7. Podsumowanie

Rak wielopostaciowy płuca jest rzadko występującym nowotworem, który stwarza duże trudności diagnostyczne i terapeutyczne. W polskiej literaturze nie ukazało się dotychczas zbiorcze opracowanie dotyczące cech kliniczno-patologicznych, badań immunohistochemicznych, czynników prognostycznych i predykcyjnych tego raka.

W prezentowanym opracowaniu, opartym na dużej grupie 107 pacjentów, skoncentrowano się na parametrach morfologicznych raka wielopostaciowego płuca, które mogłyby mieć znaczenie prognostyczne i predykcyjne. Obraz mikroskopowy korelowano z danymi klinicznymi, przede wszystkim przeżyciem całkowitym (OS) i wolnym od choroby (DFS), wynikami reakcji immunohistochemicznych oraz czynnikami uznanymi za rokownicze dla przebiegu nowotworu. Największe trudności na jakie natrafiono w czasie badania związane były z ogromną różnorodnością obrazu mikroskopowego, nawet w obrębie jednego guza.

Dane epidemiologiczne, lokalizacja i obraz kliniczny choroby były podobne do danych zawartych w piśmiennictwie. W badaniu mikroskopowym stwierdzono różnorodne typy utkania morfologicznego w identyfikacji, których okazały się bardzo pomocne badania immunohistochemiczne: p40, TTF1, E-kadheryna i AE1/AE3. Stwierdzono wysoką częstość występowania rozległej martwicy, naciekania opłucnej, inwazji naczyń limfatycznych i krwionośnych, co wiązało się z przebiegiem klinicznym choroby.

W badanych guzach stwierdzono immunohistochemicznie cechy aktywacji procesów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej, co miało głównie znaczenie diagnostyczne, ale nie rokownicze. Nie wykazano również związku markerów EMT z ekspresją PD-L1 i obecnością STAS.

Ekspresja PD-L1 w komórkach raka była dodatnia w większości guzów i silnie nasiloną w blisko połowie przypadków, co było związane z intensywnym naciekiem zapalnym w podścielisku. Nie wykazano związku występowania ekspresji PD-L1 z innymi badanymi parametrami.

Opisane niedawno zjawisko STAS, obserwowane stosunkowo często w badanej grupie, ma istotne znaczenie prognostyczne dla DFS, jednak jego ocena jest trudna, czasochłonna, a kryteria wymagają dopracowania.

Na podstawie wykonanych badań określono czynniki prognostyczne dla przeżycia całkowitego i wolnego od choroby.

Ze względu na rzadkość występowania raka wielopostaciowego, prezentowana analiza, podobnie jak prace innych autorów, ma charakter retrospektywny, co stanowi pewne ograniczenie badania. Na podkreślenie zasługuje jednak fakt, że jest to - jak dotychczas - jedyne tak rozległe opracowanie raków wielopostaciowych w Polsce, dodatkowo obejmujące przypadki wyłącznie z jednego ośrodka.

8. Wnioski

Badaną grupę stanowiło 107 pacjentów. W 100 przypadkach rozpoznano raka wielopostaciowego, w 5 raka olbrzymiokomórkowego i w 2 raka wrzecionowatokomórkowego. Ze względu na podobny obraz kliniczno-patologiczny wszystkie przypadki rozpatrywano wspólnie, jako grupę raka wielopostaciowego.

Przeprowadzone badanie pozwoliło na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Dane epidemiologiczne, lokalizacja i obraz kliniczny raka wielopostaciowego są podobne do danych zawartych w piśmiennictwie, a częstość występowania tej postaci raka w polskim materiale operacyjnym wynosi 1,6% raków płuca.
2. Określenie typów histologicznych utkania, szczególnie nabłonkowego, jest istotne rokowniczo: raki o mieszanym utkaniu gruczołowo-płaskonabłonkowym mają gorszy OS i częściej towarzyszy im inwazja naczyń limfatycznych ($p < 0,05$), raki z utkaniem płaskonabłonkowym mają lepszy DFS ($p < 0,05$), raki z utkaniem wielkomórkowym i olbrzymiokomórkowym mają tendencję do gorszego OS i DFS ($p > 0,05$).
3. Rozległość poszczególnych typów utkania nie ma znaczenia klinicznego.
4. Badania immunohistochemiczne są bardzo pomocne w diagnostyce PC. Reakcje z cytokeratyną AE1/AE3 i E-kadheryną pozwalają na identyfikację, często bardzo skąpego, komponentu nabłonkowego. Reakcje z TTF1 i p40 pomagają w określeniu różnicowania komórkowego, ale odczyny te mogą mieć różnorodną ekspresję w obrębie tego samego guza. Rozlana cytoplazmatyczna reakcja z wimentyną, w licznych komórkach, ułatwia odróżnienie PC od innych podtypów NSCLC z obecnością komórek pleomorficznych, co może być kluczowe w diagnostyce materiałów przedoperacyjnych.
5. W badanych guzach często występują cechy uważane za prognostycznie niekorzystne, takie jak: martwica (74%), inwazja naczyń krwionośnych (73%) i limfatycznych (48%), inwazja opłucnej (71%).
6. Rozległość martwicy ma istotny związek ze stopniem zaawansowania klinicznego i patologicznego ($p < 0,05$). Martwica $> 25\%$ jest niezależnym predyktorem wystąpienia nawrotu choroby lub zgonu. Rozległej martwicy $> 50\%$ często towarzyszy wysoka ekspresja PD-L1 ($p < 0,05$).

7. Ekspresja markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej: wimentyny i ZEB1 w raku wielopostaciowym jest wysoka, przy zmniejszonej ekspresji E-kadheryny, co potwierdza aktywację i istotną rolę procesów EMT w rozwoju tego nowotworu. Ekspresja markerów EMT wydaje się mieć znaczenie głównie diagnostyczne. Nie wykazano jej znaczenia prognostycznego, a także związku ze STAS i ekspresją PD-L1.
8. Zaobserwowano występowanie grupy raków z elementami pleomorficznymi, ze zróżnicowanym komponentem nabłonkowym, która nie wykazuje ekspresji markerów EMT i wiąże się z krótszym DFS. Wymaga ona dalszych badań w celu określenia jej miejsca w klasyfikacji i znaczenia klinicznego.
9. W raku wielopostaciowym obserwuje się wysoką częstość (64%) i nasilenie ekspresji PD-L1 ($\text{TPS} \geq 50\%$ -42%), co stanowi ważny czynnik predykcyjny.
10. Ekspresja PD-L1 nie ma związku z OS i DFS, ale chorzy z martwicą $>25\%$ i dodatnią ekspresją PD-L1 mają najniższą medianę DFS ($p=0,023$) i powinni być objęci systematyczną opieką w celu wczesnego wykrycia nawrotu choroby.
11. Zjawisko STAS, stwierdzone w 39% badanych guzów (39/99 przypadków), występowało u chorych z wyższym stopniem zaawansowania choroby ($p<0,05$). Nie wykazano związku pomiędzy obecnością STAS a inwazją naczyń, rozległością martwicy, typem histologicznym utkania czy rozległością komponentu mięsakowatego. Nie stwierdzono również związku z ekspresją markerów EMT.
12. Kryteria ilościowe oceny STAS zaproponowane przez Uruga i wsp. - niski i wysoki STAS - są obiecującym kierunkiem rozwoju badań nad znaczeniem rokowniczym STAS.
13. STAS ma znaczenie prognostyczne dla DFS: chorzy z obecnością STAS mają gorszy DFS w analizie jednoczynnikowej ($p<0,05$). W analizie wieloczynnikowej wartość prognostyczna STAS co do nawrotu choroby jest zmienna, co przemawia za tym, że jest to ważny czynnik rokowniczy, ale w połączeniu z innymi parametrami. Chorzy ze STAS mają tendencję do gorszego przeżycia całkowitego ($p>0,05$).
14. Czynniki prognostycznymi dla OS są:
 - w analizie jednoczynnikowej: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,014$), inwazja naczyń limfatycznych ($p=0,028$) i naczyń krwionośnych ($p=0,048$), mieszany typ komponentu nabłonkowego: gruczołowo-płaskonabłonkowy ($p=0,006$);

- w analizie wieloczynnikowej niezależnymi predyktorami są: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,037$) oraz mieszany typ komponentu nabłonkowego: gruczołowo-płaskonabłonkowy ($p=0,003$).

15. Czynniki prognostycznymi dla DFS są:

- w analizie jednoczynnikowej: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,011$), nasilenie martwicy ($p=0,004$), inwazja naczyń limfatycznych ($p=0,036$), obecność STAS ($p=0,01$) oraz obecność wysokiego STAS ($p=0,006$);
- w analizie wieloczynnikowej niezależnymi predyktorami są: martwica $>25\%$ ($p=0,015$), typ komponentu nabłonkowego - utkanie płaskonabłonkowe rokuje lepiej ($p=0,013$) oraz brak ekspresji wimentyny w komponente mięsakowatym ($p=0,022$).

9. Streszczenie

- **Wstęp**

Raki mięsakowate płuca (PSC) są niejednorodną grupą rzadkich złośliwych nowotworów nabłonkowych, które charakteryzują się histologicznie obecnością utkania przypominającego złośliwe nowotwory podścieliskowe - mięsaki. Do grupy tej zaliczane są m.in.: raki wielopostaciowe, raki wrzecionowatokomórkowe i raki olbrzymiokomórkowe.

Raki wielopostaciowe stanowią ok. 0,1-0,75% raków niedrobnokomórkowych płuca oraz ok. 1,5-3% przypadków operowanych. Występują głównie w szóstej dekadzie życia (32-89 lat), częściej u mężczyzn i mają silny związek z paleniem papierosów. Objawy kliniczne i radiologiczne są podobne jak w innych rakach płuca. W porównaniu z innymi postaciami raka niedrobnokomórkowego płuc, PC są zazwyczaj diagnozowane w wyższym stopniu zaawansowania, mają bardziej agresywny przebieg kliniczny oraz krótsze przeżycie, także w grupie chorych operowanych. Charakteryzują się również gorszą odpowiedzią na standardową chemioterapię i leczenie celowane.

- **Założenia pracy**

Ze względu na rzadkość występowania raka wielopostaciowego dane dotyczące obrazu klinicznego, morfologicznego, a także czynników rokowniczych są zróżnicowane. Większość dotychczasowych badań opiera się na niedużych, maksymalnie kilkudziesięcio-osobowych grupach chorych, co znacznie utrudnia analizę danych, wnioskowanie i wypracowanie strategii terapeutycznej dla tej grupy chorych. Brakuje również zbiorczych danych dotyczących populacji polskiej.

Rozpoznanie histopatologiczne PC opiera się na cechach morfologicznych nowotworu i nie zawsze wymaga wykonania badań immunohistochemicznych. Mogą być one jednak pomocne w określeniu podtypów morfologicznych, co może mieć wpływ na rokowanie, dalsze postępowanie diagnostyczne z materiałem, a w konsekwencji podjęcie decyzji terapeutycznych. Dane literaturowe na ten temat są bardzo zróżnicowane.

Uważa się, że w powstawaniu raków wielopostaciowych kluczową rolę odgrywają procesy transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej, co manifestuje się zmianami w ekspresji substancji nazywanych markerami EMT m.in. E-kadheryny, wimentyny i ZEB1. Stopniowa

utrata E-kadheryny jest związana z nasilającą się ekspresją ZEB1 i wimentyny, co zaobserwowano w badaniach molekularnych w rakach mięsakowatych innych narządów i jedynie w pojedynczych pracach dotyczących raków wielopostaciowych płuca. Nie jest jasne czy ekspresja tych markerów ma związek z cechami kliniczno-patologicznymi i rokowaniem.

Klasyczne strategie terapeutyczne podejmowane obecnie u chorych z rakiem wielopostaciowym tj. standardowa chemio- i radioterapia, a także terapia ukierunkowana molekularnie, nie przyniosły satysfakcjonujących efektów. Obiecującą metodą leczenia wydaje się immunoterapia oparta na lekach blokujących ujemne punkty kontroli immunologicznej, ze względu na wysoką ekspresję białka PD-L1 na komórkach PC. Wysoka ekspresja PD-L1 może mieć związek z przemianą nabłonkowo-mezenchymalną, typem różnicowania nabłonkowego oraz z agresywniejszym przebiegiem nowotworu, ale wyniki w piśmiennictwie są zróżnicowane.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na negatywny wpływ szerzenia się raka przestrzeniami powietrznymi (STAS) na przebieg choroby. Do tej pory ukazała się jedynie jedna praca dotycząca STAS w raku wielopostaciowym, gdzie wykazano ujemny wpływ tego zjawiska na rokowanie (64). Badana grupa obejmowała tylko 35 przypadków, wyłącznie z towarzyszącym zróżnicowanym komponentem nabłonkowym. Nie analizowano związku STAS z typem i rozległością komponentu mezenchymalnego, ekspresją markerów nabłonkowych czy podścieliskowych, a także z ekspresją białka PD-L1.

- **Cel pracy**

Celem pracy była retrospektywna analiza grupy chorych z rozpoznaniem raka wielopostaciowego, raka wrzecionowatokomórkowego i olbrzymiokomórkowego płuca, korelacja cech morfologicznych, immunofenotypu z danymi klinicznymi oraz określenie czynników, które byłyby istotne w planowaniu dalszego leczenia pacjenta i miałyby znaczenie dla przewidywania przebiegu choroby oraz rokowania.

W związku z tym w pracy została przeprowadzona:

1. Analiza morfologiczna raków wielopostaciowych, wrzecionowatokomórkowych i olbrzymiokomórkowych, określenie cech histologicznych: rodzaju i ilości komponentów nabłonkowego i mięsakowatego, ocena rozległości martwicy, nasilenia nacieku zapalnego,

obecności zatorów z komórek raka w świetle naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz naciekania opłucnej.

2. Ocena immunofenotypu w oparciu o odczyny immunohistochemiczne: AE1/AE3, TTF1, p40, E-kadheryna, wimentyna i ZEB1.
3. Ocena ekspresji białka PD-L1 w komponencie nabłonkowym i mięsakowatym, korelacja z typem histologicznym, immunofenotypem oraz ekspresją E-kadheryny, wimentyny i ZEB1.
4. Analiza zjawiska szerzenia się raka przestrzeniami powietrznymi (STAS), korelacja z ekspresją białka PD-L1 oraz ekspresją E-kadheryny, wimentyny i ZEB1.
5. Określenie czynników prognostycznych i predykcyjnych.

• **Materiał i metody**

Retrospektywnym badaniem objęto pacjentów operowanych w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc z powodu nowotworu płuca w latach 2000- 2019, diagnozowanych w Zakładzie Patomorfologii IGiChP. Wybraną do badania grupę stanowiło 107 pacjentów: 100 przypadków raka wielopostaciowego, 5 raka olbrzymiokomórkowego i 2 raka wrzecionowatokomórkowego, które ze względu na podobieństwo morfologiczne i cechy kliniczne, w prezentowanej pracy rozpatrywano wspólnie jako grupę raka wielopostaciowego (PC), zgodnie z najnowszą klasyfikacją WHO.

Dane kliniczne uzyskano z bazy informatycznej IGiChP. Dane na temat daty zgonu uzupełniono w oparciu o informacje otrzymane z Powszechnego Elektronicznego Systemu Ewidencji Ludności. Dodatkowe informacje uzyskano z Krajowego Rejestru Raka Płuca (KRRP) oraz Krajowego Rejestru Nowotworów. Jako wskaźniki kliniczne przyjęto przeżycie całkowite (OS) i przeżycie wolne od choroby (DFS).

Materiał reklasyfikowano zgodnie z klasyfikacją nowotworów płuca, opłucnej, grasicy i serca WHO z 2015r., a stopień zaawansowania choroby oceniano wg obowiązującej klasyfikacji TNM z 2017r. (edycja 8). Kryteria oceny mikroskopowej nie różniły się od zawartych w aktualnej klasyfikacji guzów klatki piersiowej z 2021r. W każdym przypadku zastosowano następujący panel przeciwciał immunohistochemicznych: AE1/AE3, E-kadherynę, wimentynę, TTF1, p40, ZEB1 oraz PD-L1(klon 22C3). Dodatkowo oceniano typ utkania nabłonkowego i mięsakowatego z szacunkową oceną ich rozległości, obecność

inwazji naczyń rozumianą jako obecność zatorów z komórek raka w naczyniach krwionośnych (BVI) i limfatycznych (LVI), rozległość pól martwicy, naciekanie opłucnej, nacieki zapalne i ich nasilenie. STAS oceniono w 99 przypadkach stosując definicję WHO i dodatkowo metodą półilościową zaproponowaną przez Uruga i wsp.

- **Wyniki**

1. Częstość występowania raka wielopostaciowego, na podstawie danych z KRRP, w latach 2000-2019 wyniosła 1,6% w materiale operacyjnym.
2. Rak wielopostaciowy występował częściej u mężczyzn (67M/40K), u osób starszych (mediana 65lat) i u palaczy (92,6%). Najczęściej zlokalizowany był obwodowo (78,5%) i w płatach górnych (51,4%). Mediana średnicy guza wynosiła 5,5cm. Większość chorych była w II i III stopniu zaawansowania klinicznego (30,8% i 51,4%). Najczęstszym zabiegiem operacyjnym była lobektomia (87%), a jedynie u jednego chorego wykonano tumorektomię. 90% wykonanych zabiegów było radykalnych. Dane dotyczące przebiegu klinicznego były dostępne u 70 chorych, z czego nawrót choroby wystąpił u 26 chorych (3 - wznowa miejscowa, 15 - przerzuty odległe, 3 - przerzuty i wznowa). Czas do wystąpienia wznowy wynosił średnio 2,6 lat (SD=2,21), a do wystąpienia przerzutów 1,24 lata (SD=1,63).
3. W badaniu mikroskopowym stwierdzono następujące typy tkanki nabłonkowej: rak płaskonabłonkowy (ok. 46%), rak gruczołowy (ok. 35%), rak wielkomórkowy (ok. 12%) i utkanie mieszane (gruczołowo-płaskonabłonkowe) (ok. 7%). W 22 przypadkach (20,5%) nie znaleziono zróżnicowanego komponentu nabłonkowego - w tej grupie było 5 przypadków raka olbrzymiomórkowego i 2 raka wrzecionowatomórkowego. Komponent nabłonkowy stanowił od 1% do 90% guza, średnio ok. 36% (mediana 30), w ok. 18% był widoczny jedynie ogniskowo i stanowił <10%. Komponent mięsakowaty w większości przypadków (ok. 56%) składał się z mieszanego tkanki wrzecionowato- i olbrzymiomórkowego. Utkanie wrzecionowatomórkowe występowało najczęściej w połączeniu z rakiem płaskonabłonkowym. Poza tym nie zaobserwowano wyraźnego związku typu histologicznego raka z typem komponentu mięsakowatego. Ze względu na morfologiczne podobieństwo komórek oraz ich różnorodność, rozróżnienie poszczególnych komponentów nabłonkowych i mięsakowatych oraz określenie ich stosunku ilościowego, było w wielu przypadkach bardzo trudne. Jednoczynnikowa analiza statystyczna wykazała, że obecność mieszanego

utkania gruczołowo-płaskonabłonkowego wiązała się z częstszą inwazją naczyń limfatycznych oraz krótszym OS. Była także niezależnym czynnikiem ryzyka krótszego OS. Natomiast utkanie płaskonabłonkowe było jednym z niezależnych czynników zmniejszających ryzyko wystąpienia wznowy lub zgonu. Tendencję do gorszej mediany przeżycia całkowitego obserwowano także przy utkaniu wielkokomórkowym i olbrzymiokomórkowym.

4. Martwica była obecna w 90% przypadków, w ok. 74% obejmowała ponad ¼ powierzchni wycinków. Nasilenie martwicy miało istotny związek ze stopniem zaawansowania patologicznego pT i klinicznego. Rozległa martwica >25% była jednym z niezależnych czynników krótszego DFS.
5. Zatory z komórek raka w naczyniach krwionośnych były zjawiskiem częstszym (ok. 73%) niż inwazja naczyń limfatycznych (48%). Analiza statystyczna wykazała, że inwazja naczyń limfatycznych była znamienne częstsza w guzach z mieszanym (gruczołowo-płaskonabłonkowym) komponentem raka, a rzadsza w przypadkach z utkaniem raka wielkokomórkowego. W grupie z inwazją naczyń krwionośnych średnica guza była istotnie większa, podobnie jak stopień pT.
6. W badaniach immunohistochemicznych obserwowano różnorodną ekspresję markerów nabłonkowych i mezenchymalnych. Tylko w 3 przypadkach nie stwierdzono ekspresji jakichkolwiek markerów nabłonkowych, a jedynie ekspresję markerów mezenchymalnych. Markery nabłonkowe (AE1/AE3 i E-kadheryna) częściej występowały, i miały większe nasilenie, w komponentie nabłonkowym niż mięsakowatym, przy czym ekspresja E-kadheryny była wyraźnie słabsza i rzadsza w komponentie mięsakowatym niż AE1/AE3. Ekspresję TTF1 i p40 stwierdzono zarówno w komponentie nabłonkowym, jak i mięsakowatym w zbliżonej liczbie przypadków. Reakcja z przeciwciałem przeciwko wimentynie była dodatnia w komponentie nabłonkowym w ok. 58% przypadków z obecnością tego komponentu, natomiast ujemna w komponentie mięsakowatym w 15 przypadkach. W tych przypadkach stwierdzono również ujemną ekspresję ZEB1 oraz nasiloną ekspresję markerów nabłonkowych w obu komponentach, co wskazuje na brak aktywacji procesów EMT w tych guzach.

Dodatnią reakcję z przeciwciałem ZEB1 obserwowano w utkaniu mięsakowatym w ok. 55% guzów, a w komponentie nabłonkowym w 3 przypadkach (reakcja słaba).

Z dodatnią ekspresją ZEB1 korelowało zmniejszenie ekspresji E-kadheryny. Ekspresja markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej: wimentyny, ZEB1 i E-kadheryny nie miały istotnego związku z innymi badanymi parametrami oraz z OS i DFS.

7. Dodatni odczyn z PD-L1 obserwowano w ok. 64% przypadków, w ok. 42% guzów odczyn był silny ($\text{TPS} \geq 50\%$). Odsetek dodatnich odczynów był wyższy (ok. 73%) wśród pacjentów operowanych w okresie 2010-2019 niż w całej badanej grupie ($p=0,056$). Nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji PD-L1 w komponentach nabłonkowym i mięsakowatym. Najczęściej dodatnią i silną ekspresję PD-L1 stwierdzano w guzach z utkaniem raka wielkokomórkowego, a najrzadziej w guzach z utkaniem mieszanym (gruczołowo-płaskonabłonkowym) ($p<0,05$). Dodatni odczyn obserwowano istotnie częściej w utkaniu raka gruczołowego niż płaskonabłonkowego. Silna ekspresja występowała częściej w guzach z rozległą martwicą $\geq 50\%$, oraz z intensywnym naciekiem zapalnym w obrębie guza ($p<0,05$), ale nie miała związku z nasileniem włóknienia w obrębie guza. Poza wyżej wymienionymi analiza statystyczna nie wykazała istotnego związku ekspresji PD-L1 z innymi parametrami, w tym z ekspresją markerów EMT, STAS, OS i DFS.
8. Obecność cech szerzenia się przestrzeniami powietrznymi stwierdzono w ok. 39% (18 kobiet i 21 mężczyzn). STAS występował nieco częściej w gruczolakorakach i rakach mieszanych niż w raku płaskonabłonkowym, ale nie były to różnice istotne statystycznie. Stwierdzono różne typy morfologiczne ognisk raka w przestrzeniach powietrznych, które w zależności od liczby, zakwalifikowano jako STAS o nasileniu niskim - ls (56,4%) i wysokim - hs (43,6%). STAS występował znamienne częściej u chorych z wyższym stopniem zaawansowania choroby, ale nie stwierdzono istotnego związku z innymi badanymi parametrami. W analizie jednoczynnikowej obecność STAS miała istotny związek z krótszym czasem przeżycia wolnego od choroby ($p=0,01$), ale w analizie wieloczynnikowej wartość prognostyczna STAS była zmienna w zależności od przyjętych w analizie kryteriów. Mediana OS chorych STAS(+) była niższa niż w grupie STAS(-), ale różnica nie była statystycznie znamienna ($p=0,052$). W analizie wieloczynnikowej obecność STAS nie miała wpływu na OS.
9. Dane dotyczące przeżycia całkowitego (OS) były dostępne u wszystkich chorych, w tym 36 chorych żyło w momencie zakończenia badania (30.06.2020r.). Czas obserwacji tych chorych wynosił średnio 7,43 lata ($\text{SD}=4,77$) i wahał się od 0,56 do 16,95 lat. Mediana

OS w badanej grupie wyniosła 1,92 lata, a przeżycie całkowite w horyzoncie 1 roku, 3 lat i 5 lat odpowiednio: 67,99%, 46,22% i 41,62%.

Nie zaobserwowano istotnych różnic w przeżyciu całkowitym dla kobiet i mężczyzn ($p=0,805$). W analizie jednoczynnikowej przeżycia całkowite miały znamiennej statystycznie związek ze stopniem zaawansowania ($p=0,014$), inwazją naczyń limfatycznych i ($p=0,028$) krwionośnych ($p=0,048$), typem utkania nabłonkowego (najdłuższa mediana przeżycia dla gruczolakoraków, a najkrótsza dla raków mieszanych; $p=0,006$). Zaobserwowano różnice w medianach przeżycia całkowitego pomiędzy guzami z niewielką martwicą (do 25% powierzchni) a rozległą martwicą (8,3 vs 1,55 lat), w grupie guzów z utkaniem olbrzymiokomórkowym a innym utkaniem mięsakowatym (0,52 vs 2,79 lat), w grupie STAS(+) w stosunku do grupy STAS(-) (1,43 vs 3,12 lat) oraz w grupie z wysokim STAS (hs) w stosunku do grupy STAS(-) (1,19 vs 3,12 lat), ale nie były to różnice statystycznie ($p>0,05$).

Nie wykazano związku OS z ekspresją markerów mezenchymalnych, rozległością komponentu mięsakowatego, ekspresją PD-L1.

Analiza wieloczynnikowa wykazała, że istotnymi ($p<0,05$) niezależnymi predyktorami przeżycia całkowitego były: stopień zaawansowania III/IV oraz typ mieszany komponentu nabłonkowego (tj. rak gruczołowo-płaskonabłonkowy lub kolizyjny rak gruczołowy i płaskonabłonkowy).

10. Do analizy czasu wolnego od choroby włączono 70 chorych. 24 pacjentów z tej grupy żyło w momencie zakończenia obserwacji (30.06.2020r.), średni czas obserwacji w tej grupie wynosił średnio 7,77 lata ($SD=4,99$) i wahał się od 0,56 do 15,64 lat. Mediana DFS wynosiła 1,54 lat, przeżycie wolne od choroby w horyzoncie 1 roku, 3 lat i 5 lat wynosiło odpowiednio: 63,90%, 44,12% i 35,75%. Nie zaobserwowano różnic w DFS dla kobiet i mężczyzn ($p=0,934$).

W analizie jednoczynnikowej, przeżycia wolne od choroby miały znamiennej statystycznie związek ze: stopniem zaawansowania ($p=0,011$), nasileniem martwicy ($p=0,004$), inwazją naczyń limfatycznych ($p=0,036$), obecnością STAS ($p=0,01$) i obecnością licznych ognisk STAS (wysoki STAS) ($p=0,006$).

Obserwowano różnice w medianie DFS pomiędzy chorymi z komponentem raka wielkokomórkowego a płaskonabłonkowego (0,35 vs 3,98 lat), z utkaniem mięsakowatym olbrzymiokomórkowym, w stosunku do utkania wrzecionowatokomórkowego (0,64 vs 3,98 lat) oraz grupą guzów bez i z obecnością utkania nabłonkowego (4,68 vs 1,17 lat), ale różnice nie były znamienne statystycznie ($p > 0,05$). Nie wykazano istotnych różnic w czasie przeżycia wolnego od choroby w zależności od rozległości komponentu mięsakowatego, ekspresji markerów mezenchymalnych, ekspresji i nasilenia PD-L1 oraz pomiędzy grupą z niskim i wysokim STAS.

Analiza wieloczynnikowa wykazała, że istotnymi ($p < 0,05$) niezależnymi predyktorami DFS są: martwica $> 25\%$, typ komponentu nabłonkowego oraz brak ekspresji wimentyny w komponente mięsakowatym.

- **Wnioski**

Przeprowadzone badanie pozwoliło na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Dane epidemiologiczne, lokalizacja i obraz kliniczny raka wielopostaciowego są podobne do danych zawartych w piśmiennictwie, a częstość występowania tej postaci raka w polskim materiale operacyjnym wynosi 1,6% raków płuca.
2. Określenie typów histologicznych utkania, szczególnie nabłonkowego, jest istotne rokowniczo: raki o mieszanym utkaniu gruczołowo-płaskonabłonkowym mają gorszy OS i częściej towarzyszy im inwazja naczyń limfatycznych ($p < 0,05$), raki z utkaniem płaskonabłonkowym mają lepszy DFS ($p < 0,05$), raki z utkaniem wielkokomórkowym i olbrzymiokomórkowym mają tendencję do gorszego OS i DFS ($p > 0,05$).
3. Rozległość poszczególnych typów utkania nie ma znaczenia klinicznego.
4. Badania immunohistochemiczne są bardzo pomocne w diagnostyce PC. Reakcje z cytokeratyną AE1/AE3 i E-kadheryną pozwalają na identyfikację, często bardzo skąpego, komponentu nabłonkowego. Reakcje z TTF1 i p40 pomagają w określeniu różnicowania komórkowego, ale odczyny te mogą mieć różnorodną ekspresję w obrębie tego samego guza. Rozlana cytoplazmatyczna reakcja z wimentyną, w licznych komórkach, ułatwia odróżnienie PC od innych podtypów NSCLC z obecnością komórek pleomorficznych, co może być kluczowe w diagnostyce materiałów przedoperacyjnych.

5. W badanych guzach często występują cechy prognostycznie niekorzystne, takie jak: martwica (74%), inwazja naczyń krwionośnych (73%) i limfatycznych (48%), inwazja opłucnej (71%).
6. Rozległość martwicy ma istotny związek ze stopniem zaawansowania klinicznego i patologicznego ($p < 0,05$). Martwica $> 25\%$ jest niezależnym predyktorem wystąpienia nawrotu choroby lub zgonu. Rozległej martwicy $> 50\%$ często towarzyszy wysoka ekspresja PD-L1 ($p < 0,05$).
7. Ekspresja markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej: wimentyny i ZEB1 w raku wielopostaciowym jest wysoka, przy zmniejszonej ekspresji E-kadheryny, co potwierdza aktywację i istotną rolę procesów EMT w rozwoju tego nowotworu. Ekspresja markerów EMT wydaje się mieć znaczenie głównie diagnostyczne. Nie wykazano jej znaczenia prognostycznego, a także związku ze STAS i ekspresją PD-L1.
8. Zaobserwowano występowanie grupy raków z elementami pleomorficznymi, ze zróżnicowanym komponentem nabłonkowym, która nie wykazuje ekspresji markerów EMT i wiąże się z krótszym DFS. Wymaga ona dalszych badań w celu określenia jej miejsca w klasyfikacji i znaczenia klinicznego.
9. W raku wielopostaciowym obserwuje się wysoką częstość (64%) i nasilenie ekspresji PD-L1 ($TPS \geq 50\%$ -42%), co stanowi ważny czynnik predykcyjny.
10. Ekspresja PD-L1 nie ma związku z OS i DFS, ale chorzy z martwicą $> 25\%$ i dodatnią ekspresją PD-L1 mają najniższą medianę DFS ($p = 0,023$) i powinni być objęci systematyczną opieką w celu wczesnego wykrycia nawrotu choroby.
11. Zjawisko STAS, stwierdzone w 39% badanych guzów, występowało u chorych z wyższym stopniem zaawansowania choroby ($p < 0,05$). Nie wykazano związku pomiędzy obecnością STAS a inwazją naczyń, rozległością martwicy, typem histologicznym utkania czy rozległością komponentu mięsakowatego. Nie stwierdzono również związku z ekspresją markerów EMT.
12. Kryteria ilościowe oceny STAS zaproponowane przez Uruga i wsp. - niski i wysoki STAS - są obiecującym kierunkiem rozwoju badań nad znaczeniem rokowniczym STAS.
13. STAS ma znaczenie prognostyczne dla DFS: chorzy z obecnością STAS mają gorszy DFS w analizie jednoczynnikowej ($p < 0,05$). W analizie wieloczynnikowej wartość prognostyczna STAS co do nawrotu choroby jest zmienna, co przemawia za tym, że jest

to ważny czynnik rokowniczy, ale w połączeniu z innymi parametrami. Chorzy ze STAS mają tendencję do gorszego przeżycia całkowitego ($p>0,05$).

14. Czynniki prognostycznymi dla OS są:

- w analizie jednoczynnikowej: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,014$), inwazja naczyń limfatycznych ($p=0,028$) i naczyń krwionośnych ($p=0,048$), mieszany typ komponentu nabłonkowego: gruczołowo-płaskonabłonkowy ($p=0,006$);
- w analizie wieloczynnikowej niezależnymi predyktorami są: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,037$) oraz mieszany typ komponentu nabłonkowego: gruczołowo-płaskonabłonkowy ($p=0,003$).

15. Czynniki prognostycznymi dla DFS są:

- w analizie jednoczynnikowej: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,011$), nasilenie martwicy ($p=0,004$), inwazja naczyń limfatycznych ($p=0,036$), obecność STAS ($p=0,01$) oraz obecność wysokiego STAS ($p=0,006$);
- w analizie wieloczynnikowej niezależnymi predyktorami są: martwica $>25\%$ ($p=0,015$), typ komponentu nabłonkowego - utkanie płaskonabłonkowe rokuję lepiej ($p=0,013$) oraz brak ekspresji wimentyny w komponente mięsakowatym ($p=0,022$).

Prezentowana analiza ma charakter retrospektywny, co stanowi pewne ograniczenie badania. Na podkreślenie zasługuje jednak fakt, że jest to - jak dotychczas - jedyne tak rozległe opracowanie raków wielopostaciowych w Polsce, dodatkowo obejmujące przypadki wyłącznie z jednego ośrodka.

10. Summary

- **Introduction**

Pulmonary sarcomatoid carcinoma (PSC) is a heterogeneous group of rare epithelial malignant tumours, which are histologically characterized by the presence of a component resembling malignant stromal neoplasms - sarcomas. This group includes, among others: pleomorphic carcinoma, spindle cell carcinoma and giant cell carcinoma.

Pleomorphic carcinomas constitute approx. 0.1-0.75% of non-small cell lung cancers (NSCLC) and approx. 1.5-3% of operated cases. They occur mainly in the sixth decade of life (32-89 years of age), are more common in men, and are strongly associated with cigarette smoking. Clinical and radiological symptoms are similar to those in other lung cancers. Compared to other forms of non-small cell lung cancer, PCs are usually diagnosed at a later stage, have a more aggressive clinical course and a shorter survival, also among operated patients. They also have a worse response to standard chemotherapy and targeted therapy.

- **Assumptions**

Due to the rarity of pleomorphic carcinoma, the data concerning the clinical data, morphology and prognostic factors vary. Most of the studies conducted so far have been based on small groups of patients, up to several dozen people, which makes data analysis, inference and development of a therapeutic strategy for this group of patients much more difficult. There is also no collective data on the Polish population.

Histopathological diagnosis of PC is based on the morphological features of the tumour and does not always require immunohistochemistry. However, it may be helpful in determining morphological subtypes, which may affect the prognosis, further diagnostic management of the material, and, consequently, therapeutic decisions. Literature data on this subject are very diverse.

It is believed that epithelial-mesenchymal transformation processes play a key role in the formation of pleomorphic carcinomas, which is manifested by changes in the expression of substances called EMT markers such as E-cadherin, vimentin, and ZEB1. A gradual loss of E-cadherin is related to the increasing expression of ZEB1 and vimentin, which was observed in molecular studies in pleomorphic carcinomas of other organs and only in single studies on

lung pleomorphic carcinoma. It is unclear whether the expression of these markers is related to clinical features and prognosis.

Classic therapeutic strategies currently undertaken in patients with pleomorphic carcinoma, i.e. standard chemotherapy and radiotherapy, as well as molecularly targeted therapy, do not bring satisfactory results. Immunotherapy based on drugs blocking negative immune checkpoints seems to be a promising treatment method due to the high expression of PD-L1 protein on PC cells. High PD-L1 expression may be related to epithelial-mesenchymal transformation, a type of epithelial differentiation and more aggressive course of the disease, but the results presented in the literature are varied.

In recent years, attention has been paid to the negative impact that the spread of cancer through the air spaces (STAS) has on the course of the disease. So far, one study has been published on STAS in pleomorphic carcinoma, showing its negative impact on the prognosis (64). The study group included 35 cases with the accompanying differentiated epithelial component. The relationship between STAS and the type and extent of the mesenchymal component, the expression of epithelial or stromal markers, as well as the expression of the PD-L1 protein has not been analysed.

- **The objectives**

The aim of the study is a retrospective analysis of a group of patients diagnosed with pleomorphic carcinoma, spindle cell carcinoma and giant cell carcinoma of the lung in the surgical material, correlation of morphological features, immunophenotype with clinical data, and identification of factors important in planning further treatment of the patient and predicting the course of the disease and prognosis.

Therefore, the work contains:

1. Morphological analysis of pleomorphic carcinoma, spindle cell carcinoma and giant cell carcinomas, determination of histological features: the type and extend of epithelial and sarcomatoid components, assessment of the extent of necrosis, the severity of inflammatory infiltration, the presence of blood and lymphatic vessels invasion and pleural infiltration.

2. Assessment of the immunophenotype based on immunohistochemical reactions: AE1/AE3, TTF1, p40, E-cadherin, vimentin and ZEB1.
3. Assessment of PD-L1 protein expression in epithelial and sarcomatoid components, correlation with histological type, immunophenotype and expression of E-cadherin, vimentin and ZEB1.
4. Spread through air spaces (STAS) analysis, correlation with PD-L1 protein expression and E-cadherin, vimentin and ZEB1 expression.
5. Determination of prognostic and predictive factors.

- **Material and methods**

The retrospective study covered patients operated on at the Institute of Tuberculosis and Lung Diseases due to lung cancer in 2000-2019 and diagnosed at the Institute's Department of Pathomorphology. The group selected for the study consisted of 107 patients: 100 cases of pleomorphic carcinoma, 5 cases of giant cell carcinoma and 2 cases of spindle cell carcinoma which due to their morphological similarity and clinical features, are considered in the presented study together as a group of pleomorphic carcinoma (PC), in accordance with the latest WHO classification.

Clinical data was obtained from the IT database of the Institute of Tuberculosis and Lung Diseases. Dates of death were completed on the basis of information received from the Universal Electronic System for Registration of the Population. Additional information was obtained from the National Lung Cancer Register (KRRP) and the National Cancer Register. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) were used as clinical indicators.

The material was reclassified according to the 2015 WHO classification of lung, pleura, thymus and heart cancers, and the stage of the disease was assessed according to the current TNM classification of 2017. (8th edition). The microscopic evaluation criteria did not differ from those included in the current classification of chest tumours from 2021. In each case, a panel of immunohistochemical antibodies was used, including: cytokeratin AE1/AE3, E-cadherin, vimentin, TTF1, p40, ZEB1 and PD-L1 (clone 22C3). Additionally, the following factors were assessed: the type of epithelial and sarcomatoid pattern with an estimate of their extent within the cancer, the presence of blood (BVI) and lymphatic vessels (LVI) invasion, the extent of necrosis areas, pleural infiltration, inflammatory infiltrates and their intensity. The

occurrence of STAS was examined in 99 cases, using the WHO definition and additionally with the semi-quantitative method proposed by Uruga et al. (59).

- **Results**

1. The incidence of pleomorphic carcinoma, based on data obtained from the KRRP in 2000-2019, was 1.6% in the operating material.
2. Pleomorphic carcinoma was more common in men (67M/40F), in the elderly (median 65) and in smokers (92.6%). It was most often localized peripherally (78.5%) and in the upper lobes (51.4%). The median diameter of the tumour was 5.5 cm. Most of the patients were with stage II and III (30.8% and 51.4%). The most common surgical procedure was lobectomy (87%), and only one patient underwent tumourectomy. 90% of the procedures were radical. The clinical course data were available for 70 patients; 26 relapsed (3 local recurrence, 15 distant metastases, 3 metastases and recurrence). Relapse occurred on average after 2.6 years (SD = 2.21), and metastasis after 1.24 years (SD = 1.63).
3. The squamous cell carcinoma component was found in about 46% of cases, adenocarcinoma in about 35%, large cell carcinoma in about 12% and mixed type (glandular-squamous cells) in about 7%. In 22 cases (20.5%), no differentiated epithelial component was found. This group included 5 cases of giant cell carcinoma and 2 cases of spindle cell carcinoma. The epithelial component comprised 1 to 90% of the tumour, on average approx. 36% (median 30), in approx. 18% it was visible only focally and accounted for <10%. The sarcomatoid component in most cases (approx. 56%) consisted of a mixed spindle and giant cells. The spindle cell pattern was most commonly associated with squamous cell carcinoma. Moreover, no clear relationship between the histological type of cancer and the type of the sarcomatoid component was observed. Due to the morphological similarity of cells and their diversity, distinguishing individual epithelial and sarcomatoid components and determining their quantitative ratio was in many cases very difficult. A univariate statistical analysis showed that the presence of mixed glandular and squamous cell differentiation was associated with more frequent invasion of lymphatic vessels and shorter OS. It was also an independent risk factor for shorter OS. In contrast, squamous cell tissue was one of the independent factors that decreased the risk of recurrence or death. A trend towards a worse median overall survival was also observed in large cell carcinoma and in tumours with giant cell component.

4. Necrosis was present in 90% of cases, in approx. 74% it covered more than 1/4 of the area of the sections. The intensity of necrosis was significantly related to the pT and clinical stage of advancement. Extensive necrosis > 25% was one of the independent factors of shorter DFS.
5. Blood vessels invasion was a more frequent phenomenon (about 73%) than lymphatic vessels invasion (48%). Statistical analysis showed that the invasion of lymphatic vessels was significantly more frequent in tumours with a mixed (glandular-squamous cell) epithelial component and less frequent in cases with large cell carcinoma. In the group with blood vessels invasion, the tumour diameter was significantly larger, as was the pT stage.
6. Various expressions of epithelial and mesenchymal markers were observed in immunohistochemical studies. In 3 cases, no expression of any epithelial markers was found, but only the expression of mesenchymal markers. Epithelial markers (AE1/AE3 and E-cadherin) were more frequent and more intense in the epithelial component than in the sarcomatoid component, while E-cadherin expression was clearly weaker and less frequent in the sarcomatoid component than AE1/AE3. Expression of TTF1 and p40 was found in both the epithelial and sarcomatoid parts in a similar number of cases. The reaction with the anti-vimentin antibody was positive in the epithelial component in approximately 58% of the cases with the presence of this component, and negative in the sarcomatoid component in 15 cases. In these cases, negative expression of ZEB1 and increased expression of epithelial markers in both components were also found, which indicates the lack of activation of EMT processes in these tumours.

A positive reaction with the ZEB1 antibody was observed in the sarcomatoid part in about 55% of tumours, and in the epithelial component in 3 cases (weak reaction). Positive expression of ZEB1 was correlated with a decrease in E-cadherin expression. The expression of the markers of epithelial-mesenchymal transformation: vimentin, ZEB1 and E-cadherin did not have a significant connection with other parameters, OS and DFS.

7. A positive reaction with PD-L1 was observed in about 64% of cases, in about 42% of tumours the reaction was strong (TPS ≥ 50%). The percentage of positive reactions was higher (approx. 73%) among patients operated on in the period 2010-2019 than in the entire study group (p = 0.056). No significant differences were observed in PD-L1 expression in the epithelial and sarcomatoid components. The most common positive and

strong expression of PD-L1 was found in tumours with a large cell carcinoma, and the least frequent in tumours with mixed glandular-squamous cell differentiation ($p < 0.05$). A positive reaction was observed significantly more often in adenocarcinoma than in squamous cell carcinoma. Strong expression was more common in cases with extensive necrosis $\geq 50\%$ and with intense inflammatory infiltration within the tumour ($p < 0.05$). There was no correlation between PD-L1 expression and the expression of EMT markers, STAS, OS and DFS.

8. Spread through air spaces (STAS) was found in approximately 39% (18 women and 21 men), slightly more often in adenocarcinomas and mixed carcinomas than in squamous cell carcinoma, but these differences were not statistically significant. STAS was significantly more frequent in patients with a higher stage of the disease, but no significant relationship with other parameters studied was found. Various morphological types of cancer foci in air spaces were found, which, depending on the number, were classified as STAS with low - ls (56.4%) and high - hs (43.6%) severity. Median disease-free and overall survival for the ls and hs groups did not differ significantly, but there were differences in the median OS and DFS between the hs and STAS(-) groups. In the univariate analysis, the presence of STAS and hs was significantly related to the shorter disease-free survival ($p = 0.01$ and $p = 0.006$), but in the multivariate analysis, the prognostic value of STAS for DFS was variable depending on the criteria adopted in the analysis. The median OS of STAS(+) patients was lower than in the STAS(-) group, but the difference was not statistically significant ($p = 0.052$). In multivariate analysis, the presence of STAS had no effect on OS.
9. Overall survival (OS) data were available in all patients, including 36 patients alive at the end of the study (June 30, 2020). The mean follow-up time was 7.43 years (SD = 4.77) and ranged from 0.56 to 16.95 years. The median OS in the study group was 1.92 years, and overall survival rates at 1, 3 and 5 years were 67.99%, 46.22%, and 41.62%, respectively.

There were no significant differences in overall survival for men and women ($p = 0.805$). In the univariate analysis, overall survival was statistically significantly related to the stage ($p = 0.014$), lymphatic and ($p = 0.028$) blood vessels invasion ($p = 0.048$), type of epithelial component (the longest median survival for adenocarcinomas and the shortest for mixed cancers $p = 0.006$). There were differences in the median overall survival

between tumours with small (up to 25% area) and extensive necrosis (8.3 vs 1.55 years), in the group with giant cell component and other sarcomatoid pattern (0.52 vs 2.79 years), in the STAS(+) group in relation to the STAS(-) group (1.43 vs 3.12 years), and in the hs group in relation to the STAS(-) group (1.19 vs 3.12 years), but these differences were not statistically significant ($p>0.05$).

There was no connection between OS with the expression of mesenchymal markers, the extent of the sarcomatoid component, PD-L1 expression.

Multivariate analysis showed that stage III/IV and mixed type of epithelial component (i.e. adeno-squamous carcinoma or collision adenocarcinoma and squamous cell carcinoma) were significant ($p<0.05$) independent predictors of overall survival.

10. Disease-free survival analysis (DFS) included 70 patients. 24 patients from this group were alive at the end of the study (June 30, 2020), the mean follow-up time in this group was 7.77 years (SD = 4.99) and ranged from 0.56 to 15.64 years. The median DFS was 1.54 years, the disease-free survival at 1, 3, and 5 years was 63.90%, 44.12%, and 35.75%, respectively. There were no differences in DFS for men and women ($p = 0.934$).

In the univariate analysis, disease-free survival was statistically significantly associated with: clinical stage ($p = 0.011$), severity of necrosis ($p = 0.004$), lymphatic vessels invasion ($p = 0.036$), presence of STAS ($p = 0.01$) and the presence of multiple STAS foci (high STAS) ($p = 0.006$).

There were differences in median DFS between patients with large cell carcinoma and squamous cell carcinoma (0.35 vs 3.98 years), with giant cell as compared to spindle cell component (0.64 vs 3.98 years) and the group of tumours with and without epithelial component (4.68 vs 1.17 years), but the differences were not statistically significant ($p>0.05$). There were no significant differences in disease-free survival depending on the extent of the sarcomatoid component, expression of mesenchymal markers, expression and intensity of PD-L1, and between the low and high STAS group.

Multivariate analysis showed that significant ($p<0.05$) independent predictors of DFS are: necrosis $>25\%$, type of epithelial component, and lack of vimentin expression in the sarcomatoid component.

- **Conclusions**

The conducted research allowed the following conclusions to be drawn:

1. Epidemiological data, localization and clinical picture of pleomorphic carcinoma are similar to data in the literature, and the incidence of this form of lung cancer in the Polish surgical material is 1.6%.
2. Determination of the morphological forms of the differentiation, epithelial in particular, has a prognostic significance: cancers with mixed glandular-squamous cell differentiation have worse OS and are more often accompanied by invasion of lymph vessels ($p < 0.05$), cancers with squamous cell carcinoma have a better DFS ($p < 0.05$). Large cell carcinoma and tumour with giant cell component tend to have worse OS and DFS ($p > 0.05$).
3. The extent of each type of histological component is not clinically significant.
4. Immunohistochemical tests are very helpful in PC diagnosis. Reactions with the cytokeratin AE1/AE3 and E-cadherin allow the identification of an often very sparse epithelial component. The reactions with TTF1 and p40 help to define histological differentiation, but these reactions may be expressed differently within the same tumour. A diffuse cytoplasmic reaction with vimentin in numerous cells helps to distinguish PC from other forms of NSCLC with pleomorphic cells, which may be crucial in the diagnosis of preoperative materials.
5. In the studied group of pleomorphic carcinoma, unfavourable prognostic features include: necrosis (74%), invasion of blood vessels (73%) and lymphatic vessels (48%).
6. The extent of necrosis is significantly related to the degree of clinical and pathological advancement ($p < 0.05$). Necrosis $> 25\%$ is an independent predictor of recurrence or death. Extensive $> 50\%$ necrosis is often accompanied by high PD-L1 expression ($p < 0.05$).
7. Expression of markers of epithelial-mesenchymal transformation - vimentin and ZEB1 - in pleomorphic carcinoma is high, with decreased expression of E-cadherin, which confirms the activation and important role of EMT processes in the development of this tumour. Expression of EMT markers seems to be mainly of diagnostic importance. It has not been shown to be of prognostic significance, or to be connected with STAS and PD-L1 expression.

8. There is a group of cancers with pleomorphic elements, with a differentiated epithelial component, which do not express EMT markers and are associated with a shorter DFS. It requires further research to determine its clinical relevance and classification.
9. In pleomorphic carcinoma, a high frequency (64%) and intensity of PD-L1 expression ($\text{TPS} \geq 50\%$ -42%) are observed, which is an important predictor.
10. PD-L1 expression is not related to OS and DFS, but patients with necrosis $>25\%$ and positive PD-L1 expression have the lowest median DFS ($p = 0.023$) and should be systematically followed up to detect relapse early.
11. The STAS found in 39% of the examined tumours, was more frequent in patients with a higher stage of the disease ($p < 0.05$). There was no correlation between the presence of STAS and vascular invasion, the extent of necrosis, the histological type of differentiation, or the extent of the sarcomatoid component. There was also no association with the expression of EMT markers.
12. The quantitative criteria for STAS assessment proposed by Uruga et al. - low and high STAS - are a promising direction in the development of research on the prognostic significance of STAS.
13. STAS is prognostic for DFS: patients with STAS have worse DFS in univariate analysis, especially patients with more STAS lesions ($p < 0.05$). In multivariate analysis, the prognostic value of STAS for disease recurrence is variable, indicating that it is an important prognostic factor, but in combination with other parameters. Patients with STAS tend to have poorer overall survival ($p > 0.05$).
14. The prognostic factors for OS are as follows:
 - in univariate analysis: stage III/IV ($p = 0.014$), lymphatic vessels invasion ($p = 0.028$) and blood vessels invasion ($p = 0.048$), mixed glandular and squamous epithelial component ($p = 0.006$);
 - in multivariate analysis, independent predictors are: stage III/IV ($p = 0.037$) and mixed glandular and squamous epithelial component ($p = 0.003$).
15. The prognostic factors for DFS are:

- in univariate analysis: stage III/IV ($p = 0.011$), severity of necrosis ($p = 0.004$), lymphatic vessels invasion ($p = 0.036$), presence of STAS ($p = 0.01$) and the presence of multiple STAS foci (high STAS) ($p = 0.006$);
- in multivariate analysis, the independent predictors are: necrosis $> 25\%$ ($p = 0.015$), type of epithelial component - squamous cell structure has better prognosis ($p = 0.013$) and no vimentin expression in the sarcomatoid component ($p = 0.022$).

The presented analysis is retrospective in nature, which points to a certain constraint of the study. It should be emphasized, however, that this is - so far - the only extensive study of pleomorphic carcinomas in Poland, additionally covering the cases from only one centre.

11. Piśmiennictwo

1. World Cancer Research Fund International, American Institute for Cancer Research. [Online] [Zacytowano: 06 05 2021.] <http://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/lung-cancer-statistics>.
2. Didkowska J, Wojciechowska U, Czaderny K i wsp. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2017 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów. [Online] [Zacytowano: 06 05 2021.] http://onkologia.org.pl/wp-content/uploads/Nowotwory_2017.pdf.
3. Thoracic tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021 (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 5). WHO Classification of Tumours Editorial Board. <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/35>. [Online] [Zacytowano: 06 05 2021]
4. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nature*. 2002, Tom 2, 442-454.
5. Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA i wsp. EMT:2016. *Cell*. 2016, Tom 166, 21-45.
6. Maneenil K, Xue Z, Liu M i wsp. Sarcomatoid carcinoma of the lung: the Mayo Clinic experience in 127 patients. *Clinical Lung Cancer*. 2017, Tom 19(3), e323-33.
7. Yin J, Yang Y, Ma K i wsp. Clinicopathological characteristics and prognosis of pulmonary pleomorphic carcinoma: a population-based retrospective study using SEER data. *J Thorac Dis*. 2018, Tom 10(7), 4262-73.
8. Rahouma M, Kamel M, Narula N i wsp. Pulmonary sarcomatoid carcinoma: an analysis of a rare cancer from the SEER database. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2018, Tom 53(4), 828-834.
9. Mochizuki T, Ishii G, Nagai K i wsp. Pleomorphic carcinoma of the lung. Clinicopathologic characteristic of 70 cases. *Am J Surg Pathol*. 2008, Tom 32(11), 1727-35.
10. Roesel C, Terjung S, Weinreich G i wsp. Sarcomatoid carcinoma of the lung: a rare histological subtype of non-small cell lung cancer with a poor prognosis even at earlier tumor stage. *Inter Cardiovas Thorac Surg*. 2017, Tom 24, 407-413.
11. Travis WD, Brambilla E, Burke AP i wsp. The 2015 World Health Organisation Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2015. ISBN978 92 832 2436 5.
12. Rossi G, Cavazza A, Sturm N i wsp. Pulmonary carcinoma with pleomorphic, sarcomatoid, or sarcomatous elements. *Am J Surg Pathol*. 2003, Tom 27(3), 311-324.
13. Chang YL, Lee YC, Shih JY i wsp. Pulmonary pleomorphic (spindle) cell carcinoma: peculiar clinicopathologic manifestations different from ordinary non-small cell carcinoma. *Lung Cancer*. 2001, Tom 34, 91-97.
14. Ung M, Rouquett I, Filleron T i wsp. Characteristics and clinical outcomes of sarcomatoid carcinoma of the lung. *Clin Lung Cancer*. 2016, Tom 17(5), 391-97.

15. Martin LW, Correa AM, Ordonez NG i wsp. Sarcomatoid carcinoma of the lung: a predictor of poor prognosis. *Ann Thorac Surg*. 2007, Tom 84, 973-81.
16. Venissac N, Pop D, Lassalle S i wsp. Sarcomatoid lung cancer (spindle/giant cells): an aggressive disease? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007, Tom 134(3), 619-23.
17. Veira T Antoine M, Ruppert A-M i wsp. Blood-vessel invasion is a major feature and a factor of poor prognosis in sarcomatoid carcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2014, Tom 85, 274-281.
18. Fishback N, Travis WD, Moran CA i wsp. Pleomorphic (spindle/giant cell) carcinoma of the lung. *Cancer*. 1994, Tom 73(12), 2936-2945.
19. Baldovini C, Rossi G, Ciarocchi A. Approaches to classification in pulmonary sarcomatoid carcinoma. *Lung Cancer Targ Therap*. 2019, Tom 10, 131-149.
20. Sayan M, Bas A, Valiyev E i wsp. Prognostic factors for sarcomatoid carcinoma of lung: A single-center experience. *Lung India*. 2020, Tom 37(6), 506-510.
21. Fujisaki A, Aoki T, Kasai T i wsp. Pleomorphic carcinoma of the lung: relationship between CT finding and prognosis. *Am J Roentgenol*. 2016, Tom 207(2), 289-94.
22. Li X, Wu D, Liu H, Chen J. Pulmonary sarcomatoid carcinoma: prognosis, treatment and expectations. *Ther Adv Med Oncol*. 2020, Tom 12, 1-19.
23. Pelosi G, Sonzogni A, De Pas T i wsp. Pulmonary sarcomatoid carcinoma; a practical overview. *Inter J Surg Pathol*. 2010, Tom 18(2), 103-120.
24. Yuki T, Sakuma T, Ohbayashi C i wsp. Pleomorphic carcinoma of the lung: a surgical outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007, Tom 134(2), 399- 403.
25. Pelosi G, Melotti F, Cavazza A i wsp. A modified vimentin histological score helps recognize pulmonary sarcomatoid carcinoma in small biopsy samples. *Anticancer Res*. 2012, Tom 32, 1463-1474.
26. Huang S-Y, Shen S-J, Li X-Y. Pulmonary sarcomatoid carcinoma: a clinicopathologic study and prognostic analysis of 51 cases. *World J Surg Onc*. 2013, Tom 11:252.
27. Krzakowski M, Jassem J, Antczak A i wsp. Cancer of the lung, pleura and mediastinum. *Oncol Clin Pract*. 2019, Tom 15, DOI: 10.5603/OCP.2018.0056.
28. Pelosi G, Fraggetta F, Nappi O i wsp. Pleomorphic carcinomas of the lung show a selective distribution of gene products involved in cell differentiation, cell cycle control, tumor growth, and tumor cell motility. *Am J Surg Pathol*. 2003, Tom 27, 1203-1215.
29. Sobin LH. Histological typing of lung tumors. 2nd ed. Geneva: World Health Organisation. Geneva : World Health Organisation, 1981.
30. Travis WD. Histological typing of lung tumors and pleural tumors. Geneva : World Health Organisation, 1999.
31. Travis WD. World Health Organisation classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. Geneva : World Health Organisation, 2004.

32. Cancer Staging Manual. [Online] [Zacytowano: 06 05 2021.] <http://www.cancerstaging.org>.
33. Nakajima M, Kasai T, Hashimoto H i wsp. Sarcomatoid carcinoma of the lung. *Cancer*. 1999, Tom 86(4), 608-616.
34. Weissferdt A, Kalhor N, Canales JR i wsp. Spindle cell and pleomorphic ("sarcomatoid") carcinoma of the lung: an immunohistochemical analysis of 86 cases. *Human Pathology*. 2017, Tom 59, 1-9.
35. Terra SBSP, Aubry MC, Yi ES i wsp. Immunohistochemical study of 36 cases of pulmonary sarcomatoid carcinoma - sensitivity of TTF-1 is superior to napsin. *Human Pathology*. 2014, Tom 45, 294-302.
36. Forest F, Yvarel V, Karpathiou G i wsp. Histomolecular profiling of pleomorphic, spindle cell, and giant cell carcinoma of the lung for targeted therapies. *Human Pathology*. 2016, Tom 49, 99-106.
37. Travis WD. Sarcomatoid neoplasm of the lung and pleura. *Arch Pathol Lab Med*. 2010, Tom 134, 1645-1658.
38. Naito M, Tamiya A, Takeda M i wsp. A high PD-L1 expression in pulmonary pleomorphic carcinoma correlates with parietal-pleural invasion and might predict a poor prognosis. *Intern Med*. 2019, Tom 58, 921-927.
39. Marchevsky A, LeStang N, Hiroshima K i wsp. The differential diagnosis between pleural sarcomatoid mesothelioma and spindle cell/pleomorphic (sarcomatoid) carcinomas of the lung: evidence-based guidelines from International Mesothelial Panel and the MESOPATH National reference Center. *Human Pathology*. 2017, Tom 67, 160-168.
40. Schrock A, Shuyu DL, Frampton GM i wsp. Pulmonary sarcomatoid carcinomas commonly harbor either potentially targetable genomic alterations or high tumor mutational burden as observed by comprehensive genomic profiling. *J Thorac Oncol*. 2017, Tom 12(6), 932-942.
41. Lococo F, Gandolfi G, Rossi G i wsp. Deep sequencing analysis reveals that KRAS mutation is a marker of poor prognosis in patients with pulmonary sarcomatoid carcinoma. *J Thorac Oncol*. 2016, Tom 11(8), 1282-1292.
42. Fallet V, Saffroy R, Girard N i wsp. High-throughput somatic mutation profiling in pulmonary sarcomatoid carcinoma using the LungCarta™ Panel: exploring therapeutic target. *Ann Oncol*. 2015, Tom 26, 1748-1753.
43. Mehrad M, Roy S, LaFramboise WA i wsp. KRAS mutation is predictive of outcome in patients with pulmonary sarcomatoid carcinoma. *Histopathology*. 2018, Tom 73, 207-214.
44. Tong J.H, Yeung S.F, Chan A.W.H i wsp. MET amplification and exon 14 splice site mutation define unique molecular subgroups of non-small cell lung carcinoma with poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 2016, Tom 22(12), 3048-3056.
45. Wojas-Krawczyk K. Podstawy immuno-onkologii. Warszawa : Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o., 2018.
46. Wojas-Krawczyk K, Krawczyk P. Mechanizmy działania immunoterapii chorób nowotworowych. Warszawa : Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o., 2018.

47. Chang Y-L, Yang C-Y, Lin M-W i wsp. High co-expression of PD-L1 and HIF-1 α correlates with tumor necrosis in pulmonary pleomorphic carcinoma. *Europ J Cancer*. 2016, Tom 60, 125-135.
48. Velcheti V, Rimm D, Schalper K. Sarcomatoid lung carcinomas show high levels of programmed death ligand-1 (PD-L1). *J Thorac Oncol*. 2013, Tom 8(6), 803-805.
49. Kim S, Kim M-Y, Koh J i wsp. Programmed death-1 ligand 1 and 2 are highly expressed in pleomorphic carcinoma of the lung: comparison of sarcomatous and carcinomatous area. *Euro J Cancer*. 2015, Tom 51, 2698-2707.
50. Veira T, Antoine M, Hamard C i wsp. Sarcomatoid lung cancer show high levels of programmed death ligand-1 (PD-L1) and strong immune-cell infiltration by TCD3 cells and macrophages. *Lung Cancer*. 2016, Tom 98, 51-58.
51. Lococo F, Torricelli F, Rossi G i wsp. Inter-relationship between PD-L1 expression and clinic-pathological features and driver gene mutations in pulmonary sarcomatoid carcinomas. *Lung Cancer*. 2017, Tom 113, 93-101.
52. Yvorel V, Patoir A, Casteillo i wsp. PD-L1 expression in pleomorphic, spindle cell and giant cell carcinoma of the lung is related to TTF-1, p40 expression and might indicate a worse prognosis. *PLoS ONE*. 2017, Tom 12(7), e0180346.
53. Imanishi N, Hirai A, Yoneda K i wsp. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in pleomorphic carcinoma of the lung. *J Surg Oncol*. 2018, Tom 117, 1563-1569.
54. Ağaçkiran Y, Aksu F, Akyürek N i wsp. Programmed death ligand-1 expression levels, clinicopathologic feathures, and survival in surgically resected sarcomatoid lung carcinoma. *Asia-Pac J Clin Oncol*. 2020, 1-9.
55. Chen L, Gibbons DL, Goswami S i wsp. Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumor cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun*. 2015.
56. Zhang Y, Zeng Y, Liu T i wsp. The canonical TGF-B/Smad signaling pathway is involved in PD-L1 - induced primary resistance to EGFR-TKI in EGFR-mutant non-small- cell lung cancer. *Resp Reas*. 2019, Tom 20:164, 1-11.
57. Ma K, Zhan C, Wang S i wsp. Spread through air spaces (STAS): a new pathologic morphology in lung cancer. *Clin Lung Can*. 2018, Tomy 20, No2, e158-62.
58. Warth A, Muley T, Kossakowski CA i wsp. Prognostic impact of intra-alveolar tumor spread in pulmonary adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 39, 2015, Tom 6, 793-801.
59. Uruga H, Fujii T, Fujimori S i wsp. Semiquantitative assesment of tumor spread through air spaces (STAS) in early-stage lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2017, Tom 12, 1046-51.
60. Kadota K, Nitadori J, Sima C i wsp. Tumor spread through air spaces is an important pattern of invasion and impacts the ferquency and location of reccurences after limited resection for small stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2015, Tom 10, 806- 814.

61. Lu S, Tan KS, Kadota K i wsp. Spread through air spaces (STAS) is an independent predictor of recurrence and lung cancer specific death in squamous cell carcinoma. *J Thorac Oncol.* 2017, Tom 12(2), 223-234.
62. Kadota K, Kushida Y, Katsuki N i wsp. Tumor spread through air spaces is an independent predictor of recurrence-free survival in patient with resected lung squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2017, Tom 41, 1077-1086.
63. Aly RG, Rekhtman N, Li X i wsp. Spread through air spaces (STAS) is prognostic in atypical carcinoid, large cell neuroendocrine carcinoma, and small cell carcinoma of the lung. *J Thorac Oncol.* 2019, Tom 14, 1583-1593.
64. Yokoyama S, Murakami T, Tao H i wsp. Tumor spread through air spaces identifies a distinct subgroup with poor prognosis in surgically resected lung pleomorphic carcinoma. *Chest.* 2018, Tom 154(4), 838-847.
65. Byers LA, Diao L, Wang J i wsp. An epithelial - mesenchymal transition (EMT) gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res.* 2013, Tom 19(1), 279-290.
66. Manzotti G, Torricelli F, Benedetta D i wsp. An epithelial-to-mesenchymal transcriptional switch triggers evolution of pulmonary sarcomatoid carcinoma (PSC) and identifies Desatinib as new therapeutic option. *Clin Cancer Res.* 2019, Tom 25(7), 2348-2360.
67. Liu T, Zhao X, Zheng X i wsp. The EMT transcription factor, Twist1, as a novel therapeutic target for pulmonary sarcomatoid carcinomas. *Inter J Oncol.* 2020, Tom 56, 750-760.
68. Pang A, Carhini M, Moreira L, Maki RG. Carcinosarcoma and related cancers: tumors caught in the act of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Oncol.* 2018, Tom 36(2), 210-216.
69. Manshouri R, Coyaude E, Kundu ST i wsp. ZEB1/NuRD complex suppresses TBC1D2b to stimulate E-cadherin internalization and promote metastasis in lung cancer. *Natur Communication.* 2019, Tom 10:5125, 1-15.
70. Zhang J, Lu C, Zhang J i wsp. Involvement of ZEB1 and E-cadherin in the invasion of lung squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2013, Tom 40, 949-956.
71. Sanchez-Tillo E, Lazaro A, Torrent R i wsp. Zeb1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene.* 2010, Tom 29, 3490-3500.
72. Larsen JE, Nathan V, Osborne JK i wsp. ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J Clin Invest.* 2016, Tom 126, 3219-3235.
73. Ma D-J, Liu H-S, Li S-Q i wsp. Correlations of the ZEB1 expression with incidence and prognosis of non-small cell lung carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019, Tom 23, 1528-1535.
74. Matsubara D, Kishaba Y, Yoshimoto T i wsp. Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer. *Pathol Intenat.* 2014, Tom 64, 560-568.

75. Miyahara S, Hamasaki M, Hamatake D i wsp. Clinicopathological analysis of pleomorphic carcinoma of the lung: diffuse ZEB1 expresion predicts poor survival. *Lung Cancer*. 2015, Tom 87, 39-44.
76. Ock C-Y, Kim S, Keam B i wsp. PD-L1 expression is associated with epithelial - mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016, Tom 7(13), 15901- 15914.
77. Otsuki Y, Saya H, Arima Y. Prospects for new lung cancer treatments that target EMT signaling. *Develop Dynamics*. 2018, Tom 247, 462-472.
78. Lou Y, Diao L, Parra Cuentas ER i wsp. Epithelial-mesenchymal transition is associated with a distinct tumor microenvironment including elevation of inflammatory signals and multiple immune checkpoints in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016, Tom 22(14), 3620-3642.
79. Tan TZ, Miow QH, Miki Y i wsp. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med*. 2014, Tom 6(10), 1279-1293.
80. Veira T, Girard N, Ung M i wsp. Efficacy of first-line chemotherapy in patients with advanced lung sarcomatoid carcinoma. *J Thorac Oncol*. 2013, Tom 8(12), 1574-77.
81. Kaira K, Horie Y, Ayabe E i wsp. Pulmonary pleomorphic carcinoma: a clinicopathological study including EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol*. 2010, Tom 5(4), 460-465.
82. Ushiki A, Koizumi T, Kobayashi N i wsp. Genetic heterogenity of EGFR mutation in pleomorphic carcinoma of the lung: response to gefitinib and clinical outcome. *Jpn J Clin Oncol*. 2009, Tom 39(4), 267-270.
83. Liu X, Jia Y, Stoopler M.B i wsp. NGS of pulmonary sercomatoid carcinoma reveals high frequency of actionable MET gene mutations. *J Clin Oncol*. 2016, Tom 34(8), 794-802.
84. Lee J, Choi YL, Jung HA. Outstanding clinical efficacy of PD1/PD-L1 inhibitors for pulmonary pleomorphic carcinoma. *Eur J Cancer*. 2020, Tom 130, P150-158.
85. Domblides C, Leroy K, Monnet I i wsp. Efficacy of immune checkpoint inhibitors in lung sacomatoid carcinoma. *J Thorac Oncol*. 2020, Tom 15(5), 860-866.
86. Babacan NA, Pina IB, Signorelli D i wsp. Relationship between Programmed Death Receptor-Ligand 1 expression and response to checkpoint inhibitor immunotherapy in pulmonary sarcomatoid carcinoma: a pooled analysis. *Clin Lung Cancer*. 2020, Tom 21(5), e456-63.
87. R Core Team (2000). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Online] <https://www.R-project.org/>.
88. Roesel C, Kambartel K, Kopeika U i wsp. Lazarus-type tumor response to therapy with nivolumab for sarcomatoid carcinoma of the lung. *Curr Oncol*. 2019, Tom 26(2), e270-73.
89. Sun L, Dai J, Chen Y i wsp. Pulmonary sarcomatoid carcinoma: experience from SEER database and Shanghai Pulmonary Hospital. *Ann Thorac Surg*. 2020, Tom 110, 406-413.

90. Hou J, Xing L, Yuan Y. A clinical analysis of 114 cases of sarcomatoid carcinoma of the lung. *Clin Experimental Medicine*. 2018, Tom 18, 555-562.
91. Yendamuri S, Caty L, Pine M i wsp. Outcome of sarcomatoid carcinoma of the lung: a Surveillance, Epidemiology, and End Results database analysis. *Surgery*. 2012, Tom 152(3), 397-402.
92. Blaukovitsch M, Halbwedl I, Kothmaier H i wsp. Sarcomatoid carcinomas of the lung - are these histologically heterogeneous tumors? *Virchows Arch*. 2006, Tom 449(4), 455-461.
93. Yang Z, Xu J, Li R i wsp. PD-L1 and CD47 co-expression in pulmonary sarcomatoid carcinoma: a predictor of poor prognosis and potential targets of future combined immunotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019, Tom 145(12), 3055-3065.
94. Grenda A, Krawczyk P, Błach J i wsp. Tissue MikroRNA expression as a predictor of response to immunotherapy in NSCL patients. *Front Oncol*. 2021, Tom 8(10), 563613.
95. Onozato ML, Kovach AE, Yeap BY i wsp. Tumor islands in resected early stage lung adenocarcinoma are associated with unique clinicopathological and molecular characteristics and worse prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2013, Tom 37(2), 287-294.
96. Chen D, Mao Y, Wen J i wsp. Tumor spread through air spaces in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Thorac Surg*. 2019, Tom 108, 945-54.
97. Liu H, Yin Q, Yang G, Qie P. Prognostic impact of tumor spread through air spaces in non-small cell lung carcinoma: a meta-analysis including 3564 patients. *Pathol Oncol Res*. 2019, Tom 25, 1303-1310.
98. Eguchi T, Kameda K, Lu S i wsp. Lobectomy is associated with better outcomes than sublobar resection in spread through air spaces (STAS)-positive T1 lung adenocarcinoma: a propensity score-matched analysis. *J Thorac Oncol*. 2019, Tom 14(1), 87-98.
99. Liu Y, Chen D, Qiu X i wsp. Relationship between MTA1 and spread through air space and their joint influence on prognosis of patients with stage I-III lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2018, Tom 124, 211-218.
100. Mino-Kenudson M. Significance of tumor spread through air spaces (STAS) in lung cancer from pathologist perspective. *Transl Lung Cancer Res*. 2020, Tom 9(3), 847-859.
101. Warth A. Spread through air spaces (STAS); a comprehensive update. *Transl Lung Cancer Res*. 2017, Tom 6(5), 501-507.
102. Blaauwgeers H, Russell PA, Jones KD i wsp. Pulmonary loose tumor tissue fragments and spread through air spaces (STAS): invasive pattern or artifact? A critical review. *Lung Cancer*. 2018, 107-111.
103. Thunnissen E, Blaauwgeers, de Cuba EMC i wsp. Ex vivo artifacts and histopathologic pitfalls in the lung. *Arch Pathol Lab Med*. 2016, Tom 140, 212-220.
104. Blaauwgeers H, Flieder D, Warth A i wsp. A prospective study of loose tissue fragments in non-small cell lung cancer resection specimen. *Am J Surg Pathol*. 2017, Tom 41(9), 1226-30.

105. Didkowska J, Wojciechowska U, Śliwczyński A. Raport dotyczący stopni zaawansowania, leczenia oraz przeżyć chorych na raka płuca zgłoszonych do KRN w latach 2014-2016. Warszawa : Centrum Onkologii. Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, 2019.

12. Załączniki

Załącznik 1. Klasyfikacja TNM, 8 edycja UICC (27)

Cecha T

TX Guz pierwotny nie może być oceniony lub jego obecność wykazano jedynie na podstawie obecności komórek nowotworowych w wydzielinie oskrzelowej, bez możliwości uwidocznienia w badaniu obrazowym i bronchoskopowym.

T0 Nieobecność cech guza pierwotnego

Tis Rak *in situ*

T1 Guz o średnicy nie większej niż 3 cm, otoczony mięszem płucnym lub opłucną płucną, bez naciekania oskrzeli głównych

T1a(mi) Rak gruczołowy minimalnie inwazyjny - pojedynczy guz - rak gruczołowy nie większy niż 3 cm, o przeważającym tapetującym typie wzrostu, z komponentem inwazyjnym nie większym niż 5 mm w największym wymiarze

T1a Guz o największym wymiarze 1 cm (również rzadko występujący guz pierwotny szerzący się powierzchownie, każdego wymiaru, którego składowa inwazyjna jest ograniczona do ściany oskrzela, nawet jeśli występuje w oskrzelu głównym)

T1b Guz o największym wymiarze przekraczającym 1 cm, ale nie większym niż 2 cm

T1c Guz o największym wymiarze przekraczającym 2 cm, ale nie większym niż 3 cm

T2 Guz o średnicy większej niż 3 cm, ale nie większej niż 5 cm lub guz z obecnością przynajmniej jednej spośród wymienionych cech: zajęcie oskrzela głównego bez zajęcia ostrogi głównej, naciekanie opłucnej trzewnej, towarzysząca niedodma lub zapalenie płuc dochodzące do okolicy wnęki, obejmujące zarówno część, jak i całe płuco

T2a Guz o średnicy większej niż 3 cm, ale nie większej niż 4 cm

T2b Guz o średnicy większej niż 4 cm, ale nie większej niż 5 cm

T3 Guz o średnicy większej niż 5 cm, ale nie większej niż 7 cm lub guz każdej wielkości z obecnością naciekania jednej spośród wymienionych okolic: ściana klatki piersiowej (w tym guz górnego otworu klatki piersiowej), nerw przeponowy osierdzie ścienne lub guz ze współwystępowaniem zmian satelitarnych w tym samym płacie płuca

T4 Guz o średnicy większej niż 7 cm lub guz każdej wielkości z obecnością naciekania jednej spośród wymienionych okolic: przeponę, śródpiersie, serce, wielkie naczynia, ostrogę, tchawicę, przełyk, kręgi, nerw kraniowy wsteczny lub guz każdej wielkości ze współwystępowaniem zmian satelitarnych w innym płacie tego samego płuca

Cecha N

NX Brak możliwości oceny okolicznych węzłów chłonnych

N0 Przerzuty w węzłach chłonnych okołoskrzelowych i/lub wnękowych po stronie guza pierwotnego oraz wewnątrzplucnych (w tym bezpośrednie zajęcie przez ciągłość od strony guza pierwotnego)

N2 Przerzuty w węzłach chłonnych śródpiersia po stronie guza pierwotnego i/lub rozwidlenia tchawicy

N3 Przerzuty w węzłach chłonnych śródpiersia lub wnęki po stronie przeciwnej, pod mięśniem pochyłym i/lub nadobojczykowych po stronie guza pierwotnego lub po stronie przeciwnej

Cecha M

MX Brak możliwości oceny przerzutów do narządów odległych

M0 Nieobecność przerzutów odległych

M1 Obecność przerzutów odległych

M1a Zmiany satelitarne w przeciwległym płucu, obecność guzków opłucnej/osierdzia lub obecność komórek nowotworu w płynie z jamy opłucnej/osierdzia

M1b Obecność pojedynczego przerzutu odległego w jednym narządzie

M1c Mnogie przerzuty w jednym narządzie lub przerzuty w różnych narządach

Stopień zaawansowania choroby (ang. *stage grouping*).

Stage IA	T1	N0	M0	Stage IIIA	T1a-c, T2a,b	N2	M0
Stage IA1	T1mi, T1a	N0	M0		T3	N1	
Stage IA2	T1b	N0	M0		T4	N0, N1	M0
Stage IA3	T1c	N0	M0	Stage IIIB	T1a-c, T2a,b	N3	M0
Stage IB	T2a	N0	M0		T3, T4	N2	M0
Stage IIA	T1b	N0	M0	Stage IIIC	T3, T4	N3	M0
Stage IIB	T1a-c, T2a,b	N1	M0	Stage IV	Any T	Any N	M1
	T3	N0	M0	Stage IVA	Any T	Any N	M1a,b
				Stage IVB	Any T	Any N	M1c

13. Spis tabel

<i>Tabela 1. Zmiany w klasyfikacji WHO w okresie objętym badaniem</i>	13
<i>Tabela 2. Charakterystyka stosowanych przeciwciał</i>	35
<i>Tabela 3. Czas od zabiegu operacyjnego do wystąpienia wznowy</i>	40
<i>Tabela 4. Czas od zabiegu operacyjnego do wystąpienia przerzutów</i>	40
<i>Tabela 5. Stopnie zaawansowania patologicznego i klinicznego w badanej grupie chorych, wg klasyfikacji TNM 8 edycja, 2017 UICC</i>	42
<i>Tabela 6. Udział poszczególnych typów utkania nabłonkowego w badanych guzach</i>	43
<i>Tabela 7. Udział poszczególnych typów utkania mięsakowego w badanych guzach</i>	44
<i>Tabela 8. Rozkład typów utkania nabłonkowego i mięsakowego w badanych guzach</i>	44
<i>Tabela 9. Nasilenie martwicy w badanych guzach</i>	45
<i>Tabela 10. Inwazja naczyń limfatycznych (LVI) i krwionośnych (BVI)</i>	46
<i>Tabela 11. Ekspresja badanych markerów immunohistochemicznych w komponentie nabłonkowym i mięsakowym</i>	48
<i>Tabela 12. Współczynnik ekspresji badanych markerów immunohistochemicznych w komponentie nabłonkowym i mięsakowym (stopień nasilenia reakcji x rozległość reakcji)</i>	49
<i>Tabela 13. Dodatnia ekspresja badanych markerów immunohistochemicznych w poszczególnych typach utkania histologicznego</i>	52
<i>Tabela 14. Podział, liczebność i ekspresja ZEB1 w wydzielonych grupach immunohistochemicznych</i>	53
<i>Tabela 15. Ekspresja PD-L1 w całym guzie i w poszczególnych komponentach</i>	54
<i>Tabela 16. Ekspresja PD-L1 u pacjentów operowanych w okresach 2000-2004, 2005-2009, 2010-2014, 2015-2019</i>	55
<i>Tabela 17. Częstość dodatniej ekspresji PD-L1 w zależności od typu komponentu nabłonkowego</i>	56
<i>Tabela 18. Nasilenie ekspresji PD-L1 w zależności od typu histologicznego komponentu nabłonkowego</i>	57
<i>Tabela 19. Zależność ekspresji PD-L1 w komórkach raka od nacieku zapalnego i włókienia podścieliska</i>	59
<i>Tabela 20. Występowanie STAS a typ histologiczny komponentu nabłonkowego</i>	60
<i>Tabela 21. Występowanie STAS a typ histologiczny komponentu mięsakowego</i>	60
<i>Tabela 22. Typy morfologiczne STAS</i>	60

<i>Tabela 23. Czas obserwacji chorych w dniu zakończenia badania</i>	62
<i>Tabela 24. Przeżycia całkowite w badanej grupie.....</i>	62
<i>Tabela 25. Przeżycie całkowite wobec stopni zaawansowania</i>	62
<i>Tabela 26. Przeżycie całkowite wobec nasilenia martwicy</i>	63
<i>Tabela 27. Przeżycie całkowite wobec braku lub obecności inwazji naczyń limfatycznych ...</i>	64
<i>Tabela 28. Przeżycie całkowite wobec braku lub obecności inwazji naczyń krwionośnych ...</i>	64
<i>Tabela 29. Przeżycie całkowite wobec typu histologicznego komponentu nabłonkowego.....</i>	65
<i>Tabela 30. Przeżycie całkowite wobec typu histologicznego komponentu mięsakowatego</i>	66
<i>Tabela 31. Przeżycia całkowite dla grup wyodrębnionych w oparciu o ekspresję AE1/AE3 i wimentyny</i>	67
<i>Tabela 32. Przeżycie całkowite wobec ekspresji E-kadheryny w komponentie mięsakowatym</i>	67
<i>Tabela 33. Przeżycie całkowite wobec ekspresji ZEB1 w komponentie mięsakowatym</i>	68
<i>Tabela 34. Przeżycie całkowite wobec ekspresji PD-L1 i jej nasilenia.....</i>	68
<i>Tabela 35. Przeżycie całkowite wobec obecności cech szerzenia się drogami powietrznymi STAS.....</i>	69
<i>Tabela 36. Przeżycie całkowite u chorych z wysokim (hs) i niskim (ls) STAS.....</i>	69
<i>Tabela 37. Analiza wpływu zmiennych ilościowych na czasy przeżycia całkowitego - OS.....</i>	70
<i>Tabela 38. Czas obserwacji chorych ze znaną historią pooperacyjną w dniu zakończenia badania</i>	71
<i>Tabela 39. Przeżycie wolne od choroby w badanej grupie</i>	71
<i>Tabela 40. Przeżycie wolne od choroby wobec stopnia zaawansowania</i>	72
<i>Tabela 41. Przeżycie wolne od choroby wobec rozległości martwicy.....</i>	73
<i>Tabela 42. Przeżycie wolne od choroby wobec inwazji naczyń limfatycznych.....</i>	74
<i>Tabela 43. Przeżycie wolne od choroby wobec inwazji naczyń krwionośnych</i>	74
<i>Tabela 44. Przeżycie wolne od choroby wobec typu histologicznego komponentu nabłonkowego</i>	75
<i>Tabela 45. Przeżycie wolne od choroby a typ histologiczny komponentu mięsakowatego</i>	75
<i>Tabela 46. Przeżycie wolne od choroby dla wyodrębnionych grup w oparciu o ekspresję AE1/AE3 i wimentyny</i>	76
<i>Tabela 47. Przeżycie wolne od choroby wobec ekspresji E-kadheryny w komponentie mięsakowatym</i>	76
<i>Tabela 48. Przeżycie wolne od choroby wobec ekspresji ZEB 1 w komponentie mięsakowatym</i>	77

<i>Tabela 49. Przeżycie wolne od choroby w zależności od ekspresji PD-L1</i>	<i>77</i>
<i>Tabela 50. Przeżycie wolne od choroby w zależności od rozległości martwicy i ekspresji PD-L1</i>	<i>78</i>
<i>Tabela 51. Przeżycie wolne od choroby wobec obecności cech szerzenia się raka drogami powietrznymi STAS</i>	<i>78</i>
<i>Tabela 52. Przeżycie wolne od choroby wobec ilości ognisk raka w przestrzeniach powietrznych, wg Uruga i wsp.....</i>	<i>79</i>
<i>Tabela 53. Analiza wpływu zmiennych ilościowych na przeżycie wolne od choroby - DFS...</i>	<i>81</i>
<i>Tabela 54. Porównanie wyników badań ekspresji PD-L1 w rakach mięsakowatych płuc różnych autorów.....</i>	<i>99</i>
<i>Tabela 55. Czas przeżycia całkowitego (OS), przeżycia wolnego od choroby (DFS) oraz czynniki prognostyczne w pracach różnych autorów. W zestawieniu uwzględniono jedynie prace, w których podano OS, DFS, 5-letni OS i analizę czynników prognostycznych, prace na bazach SEER oraz jedną pracę dotyczącą STAS w PC.</i>	<i>110</i>
<i>Tabela 56. Porównanie przeżycia 1- i 3-letniego względnego z badania bieżącego z danymi z KRN za okres 2014-2016.....</i>	<i>111</i>

14. Spis rycin

<i>Rycina 1. Rozległość martwicy w zależności od stopnia zaawansowania klinicznego.....</i>	<i>46</i>
<i>Rycina 2. Częstość inwazji naczyń limfatycznych w zależności od typu utkania nabłonkowego</i>	<i>47</i>
<i>Rycina 3. Inwazja naczyń krwionośnych wobec średnicy guza</i>	<i>47</i>
<i>Rycina 4. Inwazja naczyń krwionośnych wobec stopnia zaawansowania pT.....</i>	<i>47</i>
<i>Rycina 5. Rozległość martwicy a nasilenie ekspresji PD-L1</i>	<i>58</i>
<i>Rycina 6. Częstość typów morfologicznych STAS w poszczególnych utkaniach histologicznych komponentu nabłonkowego i mięsakowego</i>	<i>61</i>
<i>Rycina 7. Skumulowane prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec stopni zaawansowania</i>	<i>63</i>
<i>Rycina 8. Skumulowane prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec inwazji naczyń limfatycznych</i>	<i>64</i>
<i>Rycina 9. Skumulowane prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec inwazji naczyń krwionośnych.....</i>	<i>65</i>
<i>Rycina 10. Skumulowane prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec typu histologicznego komponentu nabłonkowego</i>	<i>66</i>
<i>Rycina 11. Krzywe przeżycia czasu wolnego od choroby oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec stopnia zaawansowania</i>	<i>72</i>
<i>Rycina 12. Krzywe przeżycia czasu wolnego od choroby oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec rozległości martwicy.....</i>	<i>73</i>
<i>Rycina 13. Krzywe przeżycia czasu wolnego od choroby oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec inwazji naczyń limfatycznych.....</i>	<i>74</i>
<i>Rycina 14. Krzywe przeżycia czasu wolnego od choroby oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec szerzenia się raka drogami powietrznymi STAS.....</i>	<i>79</i>
<i>Rycina 15. Krzywe przeżycia wolnego od choroby oszacowane metodą Kaplana-Meiera wobec ilości ognisk raka w przestrzeniach powietrznych, wg Uruga i wsp.: STAS(-), ls, hs..</i>	<i>80</i>

15. Spis fotografii

<i>Fot. 1 Utkanie raka gruczołowego, typ zrazikowy. Barwienie HE, pow. x100</i>	15
<i>Fot. 2 Utkanie raka gruczołowego, typ lity. Barwienie HE, pow. x100</i>	15
<i>Fot. 3 Utkanie raka gruczołowego, typ tapetujący. Barwienie HE, pow. x100.....</i>	16
<i>Fot. 4 Utkanie raka płaskonabłonkowego, z widocznymi komórkami pleomorficznymi.</i>	
<i>Barwienie HE, pow. x100</i>	16
<i>Fot. 5 Utkanie raka płaskonabłonkowego. Barwienie HE, pow. x100</i>	16
<i>Fot. 6 Utkanie raka wielkomórkowego. Barwienie HE, pow. x100.....</i>	17
<i>Fot. 7 Różnorodne utkania histologiczne raka. Barwienie HE, pow. x100</i>	17
<i>Fot. 8 Utkanie niezróżnicowane, utkanie olbrzymiomórkowe i rak wielkomórkowy.</i>	
<i>Barwienie HE, pow. x100</i>	18
<i>Fot. 9 Utkanie wrzecionowatomórkowe. Barwienie HE, pow. x100 i x200.....</i>	18
<i>Fot. 10 Utkanie olbrzymiomórkowe. Barwienie HE, pow. x100.....</i>	19
<i>Fot. 11 Utkanie olbrzymiomórkowe. Emperipoleza. Barwienie HE, pow. x200</i>	19
<i>Fot. 12 STAS. Brzeg guza oznaczono ciągłą linią. Grupy i pojedyncze komórki raka</i>	
<i>w przestrzeniach powietrznych oznaczone okręgiem. Barwienie HE, pow. x50</i>	32
<i>Fot. 13 STAS. Oznaczenia jw. Barwienie HE, pow. x100.....</i>	33
<i>Fot. 14 Artefakty. Barwienie HE, pow. x100</i>	33
<i>Fot. 15 Nasilenie reakcji z przeciwciałem PD-L1. Pow. x100</i>	37
<i>Fot. 16 Ekspresja AE1/AE3 w komponencie nabłonkowym i mięsakowatym. Barwienie IHC:</i>	
<i>AE1/AE3, pow. x50</i>	49
<i>Fot. 17 Ekspresja wimentyny w komponencie nabłonkowym i mięsakowatym w tym samym</i>	
<i>guzie. Barwienie IHC: wimentyna, pow. x50.....</i>	50
<i>Fot. 18 Nasilenie ekspresji ZEB1. Barwienie IHC: ZEB1, pow. x100</i>	51
<i>Fot. 19 Dodatnia ekspresja ZEB1 w komponencie wrzecionowatomórkowym (strzałka</i>	
<i>czerwona) i ujemna w komponencie płaskonabłonkowym (strzałka czarna). Barwienie IHC:</i>	
<i>ZEB1, pow. x50</i>	51
<i>Fot. 20 Dodatnia reakcja AE1/AE3 w komponencie wrzecionowatym ułatwia różnicowanie</i>	
<i>z reakcją desmoplastyczną podścieliska. Barwienie HE i barwienie IHC: AE1/AE3,</i>	
<i>pow. x200</i>	87
<i>Fot. 21 Dodatnia reakcja z cytokeratynami pomaga odnaleźć komponent nabłonkowy (ten</i>	
<i>sam obszar guza). Barwienie HE i barwienie IHC: AE1/AE3 i E-kadheryna, pow. x200</i>	87

<i>Fot. 22 Koekspresja TTF1 i p40 w komórkach raka morfologicznie płaskonabłonkowego. Barwienie HE i barwienie IHC: p40 i TTF1, pow. x200</i>	89
<i>Fot. 23 Dodatnia ekspresja p40 w raku gruczołowym. Barwienie IHC: p40, pow. x200</i>	89
<i>Fot. 24 Przypadek z obecnością komórek pleomorficznych, z dodatnią ekspresją markerów nabłonkowych i ujemną markerów EMT. Barwienie HE i barwienie IHC, pow. x200</i>	91
<i>Fot. 25 Ujemna korelacja ekspresji E-kadheryny i ZEB1: dodatnia ekspresja E-kadheryny w komponentie nabłonkowym i ujemna w mięsakowatym oraz odwrotna reakcja z ZEB1. Badanie IHC: E-kadheryna, ZEB1, pow. x200</i>	95
<i>Fot. 26 Wątpliwości diagnostyczne - STAS? T1? Większe ogniska raka (czarna strzałka) wyraźnie oddalone od brzegu guza, dodatkowo o odmiennej morfologii i ekspresji E-kadheryny niż guz (czerwona strzałka). Barwienie IHC: E-kadheryna, pow. x25</i>	105
<i>Fot. 27 Nierówny brzeg guza, granica trudna do jednoznacznego określenia. Barwienie HE, pow. x50</i>	106
<i>Fot. 28 STAS. Podobna ekspresja E-kadheryny w komponentie olbrzymiokomórkowym i w grupach komórek poza brzegiem guza (linie zielone) bywa pomocna w rozpoznaniu STAS. Barwienie IHC: E-kadheryna, pow. x25</i>	106