

HER2 receptorių ir p53 baltymo padidėjusios raiškos įtaka II stadijos krūties vėžiu sergančių moterų gyvenimo trukmei

Sigita Liutkauskienė¹, Elona Juozaitytė¹, Lina Poškienė², Darius Pranys², Kristina Jurėnienė³

¹Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Onkologijos klinika,

²Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Patologinės anatomijos klinika,

³Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Biomedicininį tyrimų institutas

Raktažodžiai: krūties vėžys, jaunos moterys, p53, HER2, išgyvenamumas.

Santrauka. Tyrimo tikslas. Ištirti p53 baltymo ir HER2 (c-erbB-2) receptorių padidėjusios raiškos įtaką II stadijos krūties vėžiu sirgusių jaunų moterų penkerių metų išgyvenamumui, atsižvelgiant į hormonų receptorių bei gydymo savitumų reikšmę.

Tyrimo medžiaga ir metodai. Retrospektyviai analizuojama 34 Kauno apskrities moterų, gydytų 2001–2003 m. Kauno onkologijos ligoninėje, medicininė dokumentacija ir archyvinė histologinė medžiaga. Tiriamųjų kontingentas – jaunos, iki 50 metų moterys, kurioms diagnozuotas ir morfologiškai patvirtintas II stadijos krūties vėžys. 22 moterys išgyveno penkerius metus, 12 mirė penkerių metų laikotarpiu. Panaudojant archyvinę histologinę medžiagą de novo, tuometinėje KMUK Patologinės anatomijos klinikoje buvo atliktas p53 baltymo ir HER2 receptorių raiškos tyrimas imunohistocheminiu metodu. Panaudojant medicininę dokumentaciją, analizuota pacientėms skirta adjuvantinė chemoterapija, antraciklinų suminė dozė ir hormoninis gydymas.

Rezultatai. Tarp visų 34 tiriamųjų 20,6 proc. atvejų rasta padidėjusi p53 baltymo raiška, 26,4 proc. atvejų – HER2 baltymo raiška. Analizuojant išgyvenamumą Kaplan–Meier metodu, nustatyta, kad mirties tikimybė penkerių metų laikotarpiu didesnė, kai naviko histologinėje medžiagoje rastas padidėjęs p53 baltymo kaupimasis, neigiami estrogenų receptoriai ir kai pacientės gydytos nepakankama antraciklino dozė (log rank $p=0,013$, log rank $p=0,02$, log rank $p=0,027$, atitinkamai).

Nerasta sąsajų tarp padidėjusios HER2 baltymo raiškos ir pacienčių penkerių metų išgyvenimo (log rank $p=0,51$). Daugiamatės analizės metodu nustatyta, kad vienintelis nepriklausomas veiksnys yra nepakankama antraciklinų dozė ($p=0,028$).

Išvada. Jaunų moterų, susirgusių II stadijos krūties vėžiu, trumpesnei gyvenimo trukmei įtakos turi padidėjusi p53 baltymo raiška, sumažinta antraciklinų dozė ir neigiami estrogenų receptoriai, o HER2 baltymo padidėjusios raiškos įtakos penkerių metų gyvenimo trukmei nepavyko įrodyti. Nepriklausomas prognozinis veiksnys yra nepakankamas adjuvantinis gydymas antraciklinais.

Įvadas

2002–2006 m. SEER (angl. *Surveillance, Epidemiology and End Results*) programos duomenimis, dažniausiai krūties vėžiu serga vyresnės moterys, tačiau apie 25 proc. atvejų ši liga diagnozuojama jaunesnėms nei 50 metų moterims (1). Klinikiniais tyrimais pagrįsta, kad jaunas amžius yra susijęs su trumpesne pacienčių gyvenimo trukme bei didesne ligos atsinaujinimo rizika (2). Deja, vis dar nežinomi biologiniai veiksniai, kurie sąlygoja blogesnes jaunų moterų, susirgusių krūties vėžiu, klinikoje baigtis.

Pagrindiniai krūties vėžio prognozės veiksniai yra naviko dydis, pažeistų sritinių limfmazgių skaičius, naviko ląstelių diferenciacijos laipsnis, hormonų receptorių buklė. Pirmaisiais dviem kriterijais pagrįsta AJCC (angl. *American Joint Committee on Cancer*) ir UICC (pranc. *Union Internationale Contra*

la Cancer, angl. *International Union Against Cancer*) organizacijų parengta krūties vėžio stadijų nustatymo sistema. Vis dėlto, nustačius ligos stadiją, naviko diferenciacijos laipsnį, hormonų receptorių buklę, ligos eiga ir prognozė gali būti nenuspėjama. Todėl tiriami kitų galimų prognozinį veiksnį: HER2 geno amplifikacijos ir baltymo raiškos, kitų EGFR (angl. *epithelial growth factor receptor*) šeimos narių raiškos, p53 geno mutacijos, ciklino E, navikinių ląstelių cirkuliacijos kraujyje arba kaulų čiulpuose įtaka ligos baigtims ir jų prognozinė vertė (3).

P53 geno mutacija nustatoma apie 20–30 proc. krūties vėžio atvejų (4). Klinikiniais tyrimais įrodyta, kad p53 geno mutacija susijusi ne tik su didesne krūties vėžio rizika, bet ir su blogesne krūties vėžio prognoze (5–8). Šis genas yra 17p chromosomoje, jis atsakingas už ląstelės branduolio fosfoprotei-

Adresas susirašinėti: S. Liutkauskienė, LSMU MA Onkologijos klinika, Eivenių 2, 50028 Kaunas
El. paštas: sigitaliu@yahoo.com

Correspondence to S. Liutkauskienė, Department of Oncology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Eivenių 2, 50028 Kaunas, Lithuania
E-mail: sigitaliu@yahoo.com

no (p53 baltymo) sintezę. Pagrindinė p53 baltymo funkcija – ląstelės proliferacijos reguliavimas, apoptozės indukavimas. P53 geno mutacija sukelia p53 baltymo struktūros pokytį (dėl to baltymas tampa stabilesniu) ir sąlygoja padidėjusį jo kiekį ląstelės branduolyje (3). Taigi, padidėjusi p53 baltymo raiška ir p53 geno mutacija yra tarpusavyje susiję.

HER2 geno amplifikacija arba padidėjusi HER2 baltymo raiška nustatoma 20–30 proc. krūties vėžio atvejų, neabejotinai susijusi su naviko agresyvumu ir bloga ligos prognoze (9). HER2 baltymas yra tirozino kinazės receptorius, kuris priklauso epidermio augimo faktorių šeimai, jį koduoja HER2 genas, esantis 17q21 chromosomoje. HER2 receptoriaus aktyvacija sukelia reakcijų kaskadą, skatinančią nekontroliuojamą ląstelių dauginimąsi. 1987 m. pirmą kartą buvo aprašyta šio receptoriaus prognozė (10). Šis mokslinis atradimas sudarė prielaidas vėlesniems klinikiškiams tyrinėjimams ir biologinės taikinių terapijos atsiradimui klinikinėje praktikoje. Krūties vėžiui gydyti šiuo metu jau skiriamas humanizuotas antikūnas trastuzumabas, blokuojantis ląstelės HER2 receptorių. Taigi, HER2 receptorių raiška šiandien ne tik prognozinis, bet ir predikcinis veiksnys.

Moterų, susirgusių II stadijos krūties vėžiu, penkerių metų išgyvenimo tikimybė 70–80 proc. Tyrimo metu siekta išaiškinti, ar p53 baltymo ir HER2 receptorių padidėjusi raiška turi įtakos 20–30 proc. tikimybei per penkerius metus mirti jaunai moteriai, kuriai diagnozuotas II stadijos krūties vėžys.

Tyrimo tikslas – nustatyti p53 baltymo ir HER2 (c-erbB-2) receptorių padidėjusios raiškos įtaką II stadijos krūties vėžiu sirgusių jaunų moterų penkerių metų išgyvenamumui, analizuojant biologinių veiksnių tarpusavio priklausomybę ir sąsajas su skirtu gydymu.

Tyrimo medžiaga ir metodai

Leidimą tyrimui išdavė Kauno regioninis biomedicininis tyrimų Etikos komitetas.

Pasinaudojant Kauno onkologijos ligoninės statistikos skyriaus duomenimis, atrinkta 2001–2003 m. II stadijos krūties vėžiu susirgusių moterų, kurios diagnozės nustatymo metu buvo ne vyresnės nei 50 metų, medicininė dokumentacija bei mirusių moterų mirties datos. Išanalizavus šių moterų klinikiškus duomenis, į tyrimą įtrauktos pacientės, kurios atitiko atrankos ir atmetimo kriterijus. Tyrimo kriterijus atitiko 34 moterys (22 išgyvenusios penkerius metus ir ilgiau ir 12 mirusiųjų penkerių metų laikotarpiu). Panaudojant archyvinę histologinę medžiagą de novo, tuometinėje KMUK Patologinės anatomijos klinikoje atliktas p53 baltymo ir HER2 receptorių raiškos tyrimas imunohistocheminiu metodu. Nuodugniai analizuota įtrauktų moterų medicininė dokumentacija, įvertinta skirta adjuvantinės chemo-

terapijos rūšis, antraciklinų suminė dozė ir skirtas hormoninis gydymas.

Tiriamųjų atrankos kriterijai:

1. 2001–2003 m. II stadijos krūties vėžiu susirgusios pacientės.
2. Diagnozės nustatymo metu pacientės jaunesnės nei 50 metų.
3. Histologiškai patvirtintas krūties vėžys.
4. Ligos stadijai patvirtinti atlikti ir dokumentuoti objektyvaus tyrimo duomenys.
5. Imunohistochemiškai ištirta estrogenų receptorių (ER) ir progesterono receptorių (PR) raiška navikinėje medžiagoje.
6. Visavertė informacija apie skirtą gydymą medicininėje dokumentacijoje.
7. Anamnezėje nėra kitos onkologinės ligos.
8. Atlikta radikali pirminio naviko pašalinimo operacija.
9. Įrašai apie pacienčių stebėseną medicininėje dokumentacijoje, gyvų pacienčių paskutinio vizito data vėlesnė nei 60 mėnesių nuo diagnozės nustatymo datos.

Tiriamųjų atmetimo kriterijai:

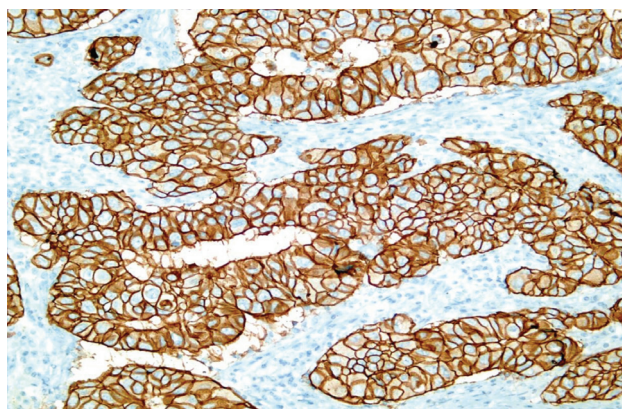
1. Netiksliai įvertinta pradinė krūties vėžio stadija.
2. Neatidžiai atrinkti nedokumentuoti objektyvaus tyrimo duomenys ligos stadijai patvirtinti.
3. Vyresnės nei 50 metų pacientės.
4. Imunohistochemiškai neištirta ER ir PR raiška histologinėje medžiagoje.
5. Nepakankama informacija apie skirtą gydymą.
6. Atlikta neradikali naviko pašalinimo operacija.

Naviko dydis ir limfmazgių būklė, kurie yra reikšmingi ligos stadijai nustatyti, buvo vertinami remiantis iki operacijos atliktų objektyvių tyrimų (mamografijos, ultragarsinio tyrimo) duomenimis ir gydytojų konsiliumo diagnoze bei įvertinus po operacijos galutinį histologinį tyrimą. Diagnozės nustatymo data mūsų tyrime buvo operacijos data, kai netaikytas neoadjuvantinis gydymas, ir klinikinio TNM (angl. *tumor, nodus, metastases*) nustatymo data, jei taikytas neoadjuvantinis gydymas. Išgyvenamumas skaičiuotas nuo diagnozės datos iki 60 mėnesių arba mirties datos.

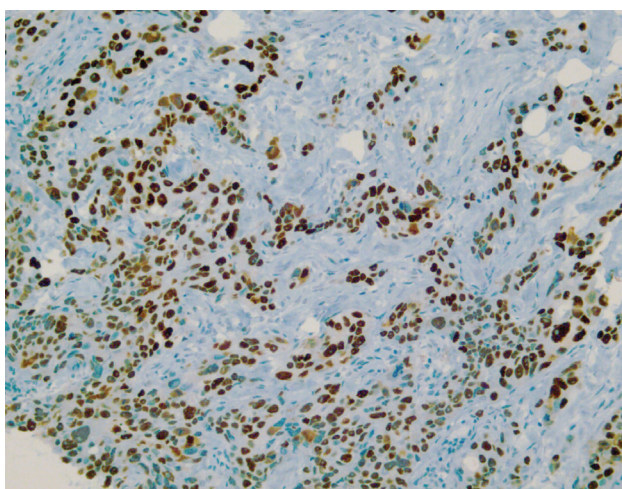
Imunohistocheminis tyrimas

Atrinkti moterų, įtrauktų į klinikinį tyrimą, histologinių preparatų parafininiai blokai, paruošti 5 µm histologinės medžiagos pjūviai. Pagal standartinę metodiką pjūviai buvo paruošti dažymui. Paruošti histologiniai preparatai buvo dažomi reagentais su antikūnais naudojant automatizuotą imunologinio dažymo sistemą („Ventana“). Imunologiniam dažymui naudoti šie antikūnai:

- HER2: triušio polikloninis baltymas prieš žmogaus HER2 baltymą (DakoCytomation, Danija).
- p53: pelės monokloninis baltymas prieš žmogaus p53 baltymą (NCL-p53-DO7, Novocastra, Didžioji Britanija).



1 pav. Krūties vėžio ląstelė, kurioje rasta padidėjusi HER2 baltymo raiška



2 pav. Krūties vėžio ląstelė, kurioje rasta padidėjusi p53 baltymo raiška

Šviesos mikroskopu buvo tiriami nudažyti histologiniai preparatai. HER2 receptorių raiška naviko ląstelės membranoje buvo vertinama nuo 0 iki 3+. Navikai, kuriuose raiška buvo 2+ ir didesnė, priskirti prie HER2 teigiamų (padidėjusi HER2 receptorių raiška) (1 pav.). P53 baltymo raiška buvo vertinama naviko ląstelių branduoliuose. Navikai, kuriuose ≥ 1 proc. ląstelių branduolių aptikta p53 baltymo raiška, priskirti padidėjusios p53 baltymo raiškos navikams, t. y. priskirti prie p53 teigiamų navikų (2 pav.).

Statistinė analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant duomenų kaupimo ir analizės programos paketą „SPSS 16.0“. Imunohistochemiškai ištirtų molekulinį žymenų, antraciklinų dozės prognozė vertė buvo tirama taikant chi kvadrato (χ^2) kriterijų, veiksnio įtaka penkerių metų išgyvenimui buvo statistiškai reikšminga, kai $p < 0,05$. Penkerių metų išgyvenamumas analizuotas Kaplan–Meier metodu, o šių kreivių palyginimui naudotas log–rank testas. Skirtumas tarp kreivių laikytas statistiškai reikšmingu, kai $p < 0,05$.

Coxo, santykinių rizikų regresijos modelis naudotas vienmatei ir daugiamatei veiksnų prognozė vertė analizei. Išanalizuota prognozė vertė veiksnų, kurie didino mirties tikimybę analizuojant išgyvenamumo kreives Kaplan–Meier metodu. Molekulinį žymenų tarpusavio priklausomybę tirta taikant tikslią Fišerio kriterijų (nustatyta sąsaja tarp veiksnų, kai tiksliojo Fišerio kriterijaus $p < 0,05$).

Rezultatai

Į klinikinį tyrimą buvo 34 pacientės: 12 mirusios (35,3 proc.) ir 22 išgyvenusios 60 mėnesių ir ilgiau (1 lentelė).

Tiriamųjų amžiaus vidurkis buvo 42,2 metų, mediana – 43,5 metai. Vidutinė stebėsenos trukmė – 51 mėnuo ($SD \pm 2,5$). Iš visų tiriamųjų 20,6 proc. atvejų rasta padidėjusi p53 baltymo raiška, 26,4

1 lentelė. Tiriamųjų (n=34) pasiskirstymas pagal analizuotus požymius

Analizuoti požymiai	n (proc.)	5 metus išgyveno (proc.)	Chi kva- drato (χ^2) kriteri- jaus p
Chemoterapija antraciklinais	26		
Doksorubicino dozė pakankama (≥ 400 mg)	13	77	0,024
nepakankama (< 400 mg)	13	30	
Naviko diferenciacijos laipsnis			0,14
1	7 (20,6)	43	
2	19 (55,9)	79	
3	8 (23,5)	50	
Naviko dydis iki operacijos			0,8
0–2 cm	2 (5,9)	50	
2–5 cm	30 (88,2)	63	
5–10 cm	2 (5,9)		
Naviko dydis po operacijos			0,4
0 cm	1 (2,9)	78	
0–2 cm	9 (26,5)	63	
2–5 cm	24 (70,6)		
Padidėję limfmazgiai iki operacijos	21 (61,8)	68	0,7
yra nėra	13 (38,2)	58	
Mts pažeisti limfmazgiai po operacijos			0,4
0	12 (35,3)	58	
1–3	14 (41,2)	79	
≥ 4	8 (23,5)	50	
Hormonų receptoriai			0,08
ER+/PR+	9	100	
ER+/PR–	5	60	
ER–/PR+	5	60	
ER–/PR–	15	47	
p53			0,04
teigiamas	7 (20,6)	29	
neigiamas	27 (79,4)	74	
HER 2			0,28
teigiamas	9 (26,4)	50	
neigiamas	25 (73,6)	69	
ER			0,035
neigiamas	20	50	
teigiamas	14	86	

proc. pacienčių – HER2 receptorių raiška. Daugumos pacienčių (55,9 proc.) histologinėje medžiagoje nustatytas vidutinis naviko diferenciacijos laipsnis. Statistiškai reikšmingai skyrėsi mirusių pacienčių skaičius per penkerius metus priklausomai nuo taikyto gydymo, nuo hormonų receptorių būklės ir p53 baltymo raiškos navikinėje medžiagoje (1 lentelė).

Gydymo savitumai

19 moterų iš 34 taikyta neoadjuvantinė chemoterapija. Naviko dydis ir limfmazgių būklė buvo vertinami iki operacijos remiantis objektyvių tyrimų (mamografijos, ultragarsinio tyrimo) duomenimis ir gydytojų konsiliumo diagnoze bei po operacijos įvertinus galutinį histologinį tyrimą. Po neoadjuvantinės chemoterapijos visoms moterims atlikta radikali naviko pašalinimo operacija. Operacijų apimtys – 30 moterų atlikta mastektomija; 4 moterims – krūtį tausojamoji operacija. Po operacijos visos moterys, kurioms buvo histologiškai nustatyti išreikšti hormonų receptoriai, gydytos hormonų terapija. Analizuojant chemoterapijos savitumus, antraciklinų (doksorubicino) dozė įvertinta 26 moterims, kurios gavo tokio pobūdžio sisteminį gydymą. Suminė doksorubicino dozė vertinta kaip pakankama, kai ji buvo lygi arba didesnė nei 400 mg, traktuota kaip nepakankama, kai buvo mažesnė nei 400 mg. Į antraciklinų dozės įtakos penkerių metų išgyvenimui tyrimą neįtrauktos aštuonios moterys: penkioms moterims adjuvantinė chemoterapija neskirta; trims tiriamosioms skirta adjuvantinė chemoterapija pagal CMF schemą (ciklofosfamidą, metotreksatą ir fluorouracilą). Iš 13 pacienčių, kurioms skirta nepakankama doksorubicino dozė, šešioms gydymas pratęstas adjuvantine chemoterapija pagal CMF (ciklofosfamidą, metotreksatą, fluorouracilą).

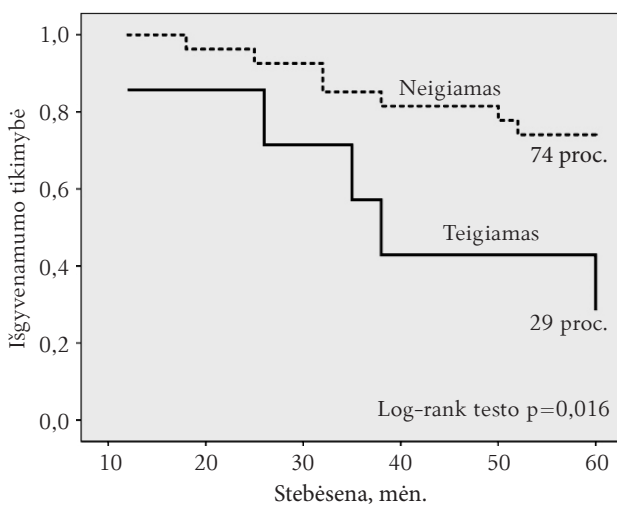
Penkerių metų išgyvenamumo analizė

Penkerių metų gyvenimo trukmės priklausomybė nuo molekulinių žymenų analizuota taikant chi kvadrato (χ^2) kriterijų ir Kaplan-Meier metodą. Šiais statistinės analizės metodais nustatyta, kurie veiksniai turi įtakos jaunų moterų, susirgusių II stadijos krūties vėžiu, penkerių metų gyvenimo trukmei, kaip didėja mirties rizika penkerių metų laikotarpiu. Nustatyta, kad didesnę tikimybę mirti per penkerius metus turi tos moterys, kurių naviko histologinėje medžiagoje rasta padidėjusi p53 baltymo raiška ($p=0,025$), neigiami estrogenų receptoriai ($p=0,032$), gydytos nepakankama antraciklinų doze ($p=0,018$). HER2 receptorių padidėjusi raiška penkerių metų gyvenimo trukmei įtakos neturėjo ($p=0,5$).

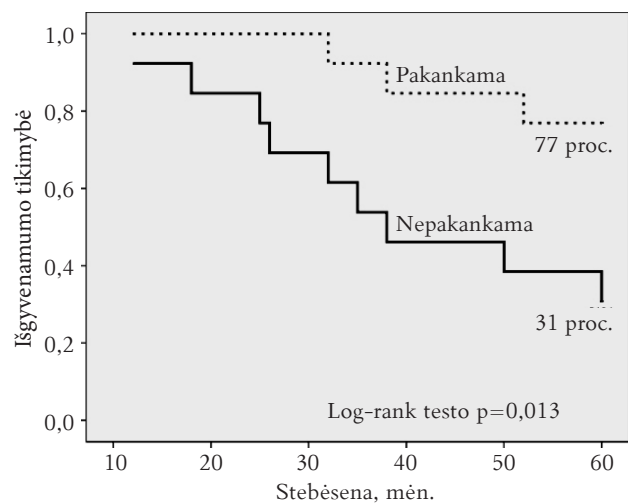
Kaplan-Meier metodu lyginant išgyvenamumo kreives, nustatyta, kad mirties rizika penkerių metų laikotarpiu yra didesnė toms moterims, kurių histologinėje medžiagoje imunohistochemiškai rasta padidėjusi p53 baltymo raiška (log rank $p=0,016$) (3 pav.), nepakankama antraciklinų dozė (log rank $p=0,013$) (4 pav.), neigiami ER (log rank $p=0,027$) (5 pav.). Mirties rizika padidėja 45 proc. radus padidėjusią p53 baltymo raišką, 36 proc. – esant neigiamiems estrogenų receptoriams histologinėje medžiagoje, 46 proc. – skyrus nepakankamą antraciklinų dozę. HER2 receptorių neigiamos įtakos penkerių metų laikotarpiu įrodyti nepavyko (log rank $p=0,51$).

Molekulinių žymenų prognozinių vertės analizė

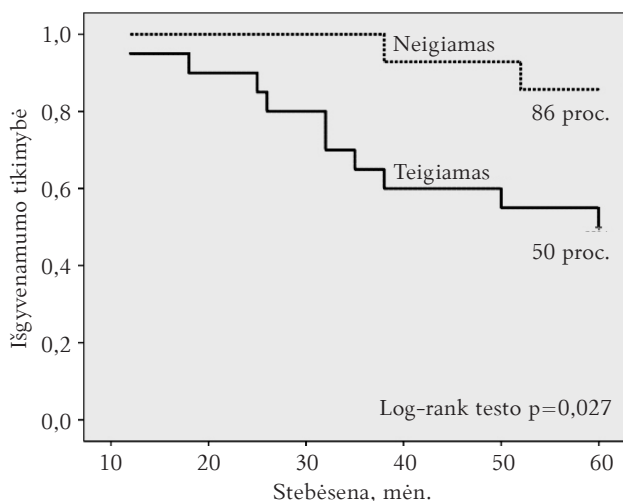
Norėdami įvertinti tirtųjų veiksnių prognozinę vertę, atlikome vienmatę ir daugiamatę analizę panaudodami Coxo santykinių rizikų regresijos modelį. Prognozių veiksnių vienmatę analizę parodė,



3 pav. Moterų, sergančių II stadijos krūties vėžiu, išgyvenamumo tikimybės palyginimas pagal Kaplan-Meier priklausomai nuo p53 baltymo raiškos



4 pav. Moterų, sergančių II stadijos krūties vėžiu, išgyvenamumo tikimybės palyginimas pagal Kaplan-Meier, kai doksorubicino dozė nepakankama (<400 mg) ir kai doksorubicino dozė pakankama (≥400 mg)



5 pav. Moterų, sergančių II stadijos krūties vėžiu, išgyvenamumo tikimybės palyginimas pagal Kaplan-Meier priklausomai nuo ER būklės

kad padidėjusi p53 baltymo raiška, nepakankama antraciklinų dozė ir neigiami ER yra neigiami prognoziniai veiksniai ir didina sergančiosios krūties vėžiu riziką mirti per penkerius metus (2 lentelė).

Į daugiamačią Coxo santykinių rizikų regresijos modelio analizę įtraukėme tuos veiksnius, kurių įtaka penkerių metų gyvenimo trukmei buvo statistiškai reikšminga pritaikius chi kvadrato (χ^2) kriterijų, įvertinus Kaplan-Meier išgyvenamumo kreives ir įvertinus veiksnio prognozinę vertę taikant Coxo santykinių rizikų regresijos modelio vienmatę analizę (2 lentelė). Tyrimo duomenimis, vienintelis nepriklausomas veiksnys, turėjęs įtakos jaunų moterų penkerių metų išgyvenamumui buvo nepakankamas adjuvantinis gydymas antraciklinais. Sumažinta chemoterapinių vaistų dozė 5,19 karto didina pacientės riziką mirti per penkerius metus ($p=0,028$).

p53, HER2 ir ER tarpusavio priklausomybės analizė

Atlikta molekulinė žymenų tarpusavio priklausomybės analizė taikant tiksliųjį Fišerio kriterijų (3 lentelė). Tyrimo duomenimis, p53 baltymą kaupiančios navikinės ląstelės turi polinkį būti HER2 teigiamomis ($p=0,037$) ir ER neigiamomis ($p=0,026$). Nerasta sąsajos tarp HER2 padidėjusios raiškos ir neigiamų ER receptorių.

Rezultatų aptarimas

Lietuvoje pirmą kartą imunohistochemiškai tirta ir analizuota p53 baltymo raiška naviko ląstelėse. Mūsų atlikto klinikinio tyrimo metu padidėjusi šio baltymo raiška nustatyta 20,6 proc. atvejų, taigi, dažnis sutapo su pateikiamu dažniu kituose literatūros šaltiniuose (3).

Šio retrospektyviojo klinikinio tyrimo tikslas – ištirti molekulinę žymenų: p53 baltymo raiškos ir HER2 receptorių raiškos prognozinę vertę labai homogeniškoje pacienčių grupėje, kurioje prognozuojamos panašios ligos baigtys atsižvelgiant į moters amžių ir ligos stadiją. Klinikiniais tyrimais įrodyta, kad jaunas amžius yra nepriklausomas blogos krūties vėžio prognozės veiksnys, turintis įtakos trumpesnei pacienčių gyvenimo trukmei, didesnei ligos atsinaujinimo rizikai. Vieno tyrimo duomenimis, 35–44 metų moterys, sergančios krūties vėžiu, turi du kartus didesnę tikimybę mirti per 10 metų palyginus su 55–64 metų moterimis (2). Randomizuotų perspektyviųjų krūties vėžio klinikinių tyrimų trūkumas yra tas, kad tik 28 proc. analizuoja pacientų ligos baigtis priklausomai nuo amžiaus, nors dauguma jų pateikia duomenis apie tiriamųjų amžių.

2008 m. publikuotame C. K. Anders ir kt. klinikiniam tyrimo buvo įvardyti krūties vėžio genų rinkiniai, susiję su ląstelės imuninėmis funkcijomis, signalo perdavimu, išgyvenamumu, kurie skyrė-

2 lentelė. Prognozinio veiksnio įtakos išgyvenamumui analizė pagal Coxo santykinių rizikų regresijos modelį

Prognozinis veiksnys	Vienmatė analizė		Daugiamatė analizė	
	SR (95 proc. PI)	p	SR (95 proc. PI)	p
P53+	3,71 (1,17–11,77)	0,026	0,67 (0,17–2,67)	0,57
Nepakankama antraciklino dozė	4,54 (1,22–16,89)	0,024	5,19 (1,19–22,57)	0,028
ER–	4,68 (1,02–21,45)	0,047	4,337 (0,79–3,73)	0,091

3 lentelė. p53, HER2 ir ER tarpusavio priklausomybė

Veiksnys	p53+		ER–	
	n/iš viso (proc.)	p	n/iš viso (proc.)	p
HER2				
neigiamas	3/7 (42,9)		14/20 (70)	
teigiamas	4/7 (57,1)	0,037	6/20 (30)	0,40
p53				
neigiamas			13/20 (65)	
teigiamas			7/20 (35)	0,026

si jaunų moterų (≤ 45 metai) nuo vyresnių moterų (≥ 65 metai) molekuliniame lygmenyje. Deja, iki šiol lieka neaišku, ar šie genai turi įtakos jaunų moterų krūties vėžio blogesnėms klinikinėms baigtims (11).

Mūsų klinikinio tyrimo duomenų analizė parodė, kad p53 geno mutacija yra veiksnys, didinantis mirties riziką, HER2 geno neigiamos įtakos šiame tiriamųjų kontingente įrodyti nepavyko. Gali būti, kad HER2 geno neigiamai įtakai įrodyti nepakako tiriamųjų skaičiaus. Kita vertus, atlikta labai nedaug klinikinių tyrimų, kuriuose p53 baltymo ir HER2 receptorių raiška būtų tirta ir vertinta atskirose amžiaus grupėse ir atsižvelgiant į krūties vėžio stadiją. Vienas iš tokių klinikinių tyrimų, kurio duomenys panašūs su mūsų klinikinio tyrimo analogiškais duomenimis, nurodo HER2 receptorių raiškos prognozinę vertę moterų iki 35 metų grupėje, o p53 baltymo raiškos – moterų, vyresnių nei 35 metų grupėje. Straipsnio autoriai padarė išvadą, kad yra tam tikri krūties vėžio biologiniai skirtumai, turintys įtakos prognozei tam tikrose amžiaus grupėse (12).

Siekiant įvertinti p53 ir HER2 baltymų prognozinę vertę, taikyti Coxo vienmatės ir daugiamatės analizės metodai. Nustatyta, kad reliatyvi rizika jaunai moteriai mirti per penkerius metus nuo II stadijos krūties vėžio padidėja 3,7 karto, kai yra nustatyta p53 geno mutacija. Į daugiamatę analizę įtraukus ir taikytą gydymą, rasta, kad nepriklausomas prognozinis veiksnys yra nepakankamas adjuvantinis gydymas antraciklinais. Sumažinta chemoterapinių vaistų dozė 5,19 karto didina pacientės riziką mirti per penkerius metus ($p=0,028$). Literatūroje nepavyko rasti nė vieno klinikinio tyrimo, kuriame vienu metu būtų vertinta molekulinių žymenų ir taikyto gydymo prognozinė vertė. Tą sąlygoja keletas priežasčių. Viena iš jų ta, kad daugelis panašių tyrimų atlikta naudojant įtrauktą į randomizuotus klinikinius tyrimus pacienčių histologinę medžiagą, tai yra visos pacientės buvo įtrauktos į tyrimą pagal atitinkamus kriterijus ir gydytos vienodai, t. y. nebuvo galima vaistų dozės redukcija, kuri pasitaiko klinikinėje praktikoje ir turi įtakos gydymo rezultatams. Kiti tyrimai – perspektyvieji, kuriuose pacientėms buvo privaloma skirti vienodą gydymą pagal protokolą. Yra ir tokių tyrimų, kuriuose tirta retrospektyvioji histologinė medžiaga, bet taikyto gydymo įtaka neanalizuota, nes nerasta ryšio tarp fundamentalaus ir klinikinio problemos nagrinėjimo (7).

Mūsų klinikinio tyrimo trūkumas – nedidelė tiriamųjų imtis: į tyrimą įtrauktos 34 pacientės, iš kurių 12 buvo mirusios. Tyrimų imtį riboja dideli atlie-

kamų histologinių tyrimų kaštai. Kita vertus, tokio pobūdžio tyrimai yra kohortiniai, todėl tiriamųjų imčiai keliami ne tokie griežti reikalavimai. Taigi, neaišku, ar HER2 baltymo padidėjusi raiška neturi prognozinės vertės šiame tiriamųjų kontingente, ar to įrodyti nepavyko dėl per mažos klinikinio tyrimo statistinės galios (0,57). Nepakankamą tyrimo statistinę galią sąlygojo tyrimo metodikos sąlygos: šis tyrimas yra retrospektyvusis ir, siekiant išlaikyti tiriamųjų grupės homogeniškumą, buvo taikyti griežti pacienčių atrankos ir atmetimo kriterijai, o tai riboja tiriamųjų imties dydį. Tačiau ši klinikinio tyrimo metodika turi ir privalumų: pacientės tirtos ir gydytos vienoje gydymo įstaigoje – vienoje laboratorijoje imunohistochemiškai tirta ER ir PR raiška; visoms pacientėms taikyti panašūs tyrimo, gydymo, ligos stebėsenos metodai; išvengta gydymo taktikos pakeitimų.

Optimalaus adjuvantinio krūties vėžio gydymo parinkimas priklauso nuo prognozinės ir predikcinės veiksnų. Klinikiniuose tyrimuose analizuojama p53 geno ne tik prognozinė, bet ir predikcinė vertė. Viena iš klinikinio tyrimo, analizavusio šio geno predikcinę vertę, duomenimis, pacientų, kurių navikinėje medžiagoje buvo išreikšta HER2 baltymo ir p53 baltymo raiška, išgyvenamumas pagerėjo skiriant didelių dozių adjuvantinę chemoterapiją pagal FAC (fluorouracilu, doksorubicinu, ciklofosfamidą) schemą (13). Dar viename 2006 m. publikuotame straipsnyje teigiama, kad p53 genas reguliuoja atsaką į gydymą antimikrotubuliniais vaistais (taksanais ir vinca alkaloidais) (14).

Šis klinikinis tyrimas – pirmasis Lietuvoje, kuriame imunohistochemiškai buvo tiriama p53 baltymo raiška navikinėse ląstelėse. Nepaisant minėtų tyrimo trūkumų, šiuo tyrimu galima remtis inicijuojant perspektyvius tyrimus, kurių metu būtų galima tirti ne tik prognozinę, bet ir predikcinę šio baltymo vertę. Molekulinių žymenų prognozinės ir predikcinės vertės tyrimai yra viena prioritetinių šiuolaikinio mokslo kryptų.

Išvados

Padidėjusi p53 baltymo raiška, neigiami estrogenų receptoriai ir nepakankamas gydymas antraciklinais turi neigiamą įtaką jaunų moterų, sergančių II stadijos krūties vėžiu, penkerių metų išgyvenamumui ir didina jų mirties riziką. HER2 receptorių raiškos neigiamos įtakos išgyvenimui įrodyti nepavyko.

Nepriklausomas prognozinis veiksnys yra nepakankamas adjuvantinis gydymas antraciklinais.

Impact of p53 protein and HER2 overexpression on survival of patients with stage II breast cancer

Sigita Liutkauskienė¹, Elona Juozaitytė¹, Lina Poškienė², Darius Pranys², Kristina Jurėnienė³

¹Department of Oncology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences,

²Department of Pathology, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences,

³Institute for Biomedical Research, Medical Academy, Lithuanian University of Health Sciences, Lithuania

Key words: breast cancer; young women; p53 protein; human epidermal growth factor receptor 2; survival.

Summary. Objective. To assess the prognostic significance and impact of p53 protein and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) overexpression on 5-year survival in young patients with stage II breast cancer (aged less than 50 years).

Material and methods. Material from medical records and archived tumor tissues from 34 young women diagnosed with stage II breast cancer and obtained between 2001 and 2003 was analyzed retrospectively. Twelve (35%) patients died from breast cancer. Using archived tumor tissues, p53 protein and HER2 overexpression was determined immunohistochemically. Using medical records, and adjuvant chemotherapy, adequacy of anthracycline dose, and hormonotherapy administered for the patients were analyzed.

Results. p53 protein and HER2 overexpression was documented in 20.6% and 26.4% of women, respectively. Kaplan-Meier survival analysis showed that patients with tumors positive for p53 protein and negative estrogen receptors, and treated with an inadequate dose of anthracyclines died within shorter period after diagnosis (log-rank $P=0.016$, log-rank $P=0.027$, log-rank $P=0.013$, respectively). There were no significant associations between HER2 overexpression and 5-year survival in this population (log-rank $P=0.51$). Multivariate analysis revealed that an inadequate dose of anthracyclines ($P=0.028$) was the only independent factor for poor outcome.

Conclusions. p53 protein overexpression, negative estrogen receptors in tissue samples, and inadequate chemotherapy with anthracyclines were associated with reduced overall survival in young women with stage II breast cancer. Inadequate adjuvant therapy with anthracyclines was the only independent prognostic factor.

Literatūra

1. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) program. Available from: URL: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>
2. Arriagada R, Le MG, Dunant A, Tubiana M, Contesso G. Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma: correlation between clinicopathologic factors and the risk of death in each 5-year period. *Cancer* 2006;106:743-50.
3. Gonzales-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 2007;608:1-22.
4. Kerns BJ, Jordan AP, Moore HM, Humphrey AP, Berchuk A, Kohler FM, et al. p53 overexpression in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue detected by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1992;40:1047-51.
5. Thor AD, Moore DH II, Edgerton SM, Kawasaki ES, Reihnsaus E, Lynch TH, et al. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:845-55.
6. Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fugua SA, Brown RW, Chamness GC, et al. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:200-6.
7. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966-78.
8. Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z, Kobayashi S, et al. Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:R24-30.
9. Offersen BV, Alsner J, Olsen KE, Riisbro R, Bruner N, Sorensen FB, et al. A comparison among HER2, TP53, PAI-1, angiogenesis, and proliferation activity as prognostic variables in tumours from 408 patients diagnosed with early breast cancer. *Acta Oncol* 2008;47:618-32.
10. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
11. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol* 2008;26:3324-30.
12. Bertheau P, Sternberg SM, Merino MJ. C-erbB-2, p53, and nm23 gene expression in breast cancer in young women: immunohistochemical analysis and clinicopathologic correlation. *Hum Pathol* 1998;29(4):323-9.
13. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, et al. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1346-60.
14. Hait WN, Yang JM. The individualization of cancer therapy: the unexpected role of p53. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2006;117:85-101.

Straipsnis gautas 2009 09 04, priimtas 2010 12 07

Received 4 September 2009, accepted 7 December 2010