

Received: 12.10.2007

Accepted: 12.12.2007

Published: 31.01.2008

Prognostic significance of HER-2/neu expression in patients at early clinical stages of invasive cervical cancer

Znaczenie prognostyczne ekspresji HER-2/neu u chorych na wczesne postacie inwazyjnego raka szyjki macicy

Практическое значение выразительности ХЭР-2/неу у больных страдающих ранними формами инвазионного рака шейки матки

¹ Klinika Nowotworów Narządów Płciowych Kobięcych, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie.
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Mariusz Bidziński

² Zakład Patologii, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie.
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Włodzimierz Olszewski

Correspondence to: Klinika Nowotworów Narządów Płciowych Kobięcych, Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie, ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

Source of financing: Department own sources

Summary

HER-2/neu overexpression is considered an important prognostic factor, which may predict an aggressive clinical course of several tumours, including cervical cancer. **Material and method:** HER-2/neu expression was assessed by immunohistochemical technique in 298 patients with stage IB and IIA cervical cancer, of either planoepithelial or adenomatous type. HER-2/neu expression was compared in groups of patients selected based on generally accepted prognostic factors, e.g. clinical stage, histological type, presence of metastases to regional lymph nodes, invasion of vascular space and degree of radiation-induced destruction of tumor. Using the Cox model, a multivariate analysis of effect of selected prognostic factors was performed, both in relation to overall survival and to symptom-free survival. **Results:** Positive reaction to HER-2/neu was obtained in 135 cases (45.3%); the reaction was pronounced (3+) in 23 cases (7.8%) and moderate (2+) in 41 cases (13.7%). No positive reaction was obtained in 163 cases (54.7%). Analysis of survival yielded the following results: probability of 5-year overall survival for the entire patient population was 90.9% and that of 10 years – 85.2%. Overall survival curve for the entire study population is presented. Recurrence-free 5- and 10-year survival rates were 83.3% and 82.3%, respectively. Symptom-free 5- and 10-year survival rates were significantly influenced by: lymph node involvement and their number, invasion of vascular space, histological type and HER-2/neu expression. Cox analysis demonstrated a significant correlation between risk of recurrence or death and the following factors: lymph node metastases and their number, invasion of vascular space, histological type of tumour and HER-2/neu expression. The risk of recurrence or death with a single nodal metastasis and several nodal metastases is 2.4- and 5.1-fold greater than when no nodal metastases are present. The fact of vascular space involvement results in a 3-fold increase of risk of recurrence or death. In the case of planoepithelial cancer, the risk of recurrence or death is 0.4-fold that for adenomatous cancer. Finding of a strong HER-2/neu expression (2+, 3+) increases 2.7-fold the risk of therapeutic failure. **Conclusions:** No statistically significant differences were found in the HER-2/neu expression in groups of patients defined based on clinical-pathological parameters (i.e. clinical stage, histological type, regional lymph node metastases, radiation-induced cervix sterilization). The following prognostic factors had a significant impact on symptom-free survival: histological type, presence and numbers of lymph node metastases, invasion of vascular space, as well as TP53, BCL2 and HER-2/neu expression. Among all factors analysed, most significant prognostic impact, both in terms of overall survival and symptom-free survival, was associated with involvement of pelvic lymph nodes.

Key words: cervical cancer, prognostic factors, immunohistochemistry, HER-2/neu expression, survival rate and mortality rate

Streszczenie

Nadekspresja HER-2/neu uważana jest za istotny czynnik prognostyczny mogący wskazywać na agresywny przebieg kliniczny wielu nowotworów, w tym RSM. **Materiał i metody:** Posługując się metodą immunohistochemiczną, przeprowadzono ocenę ekspresji HER-2/neu u 298 chorych leczonych z powodu RSM w stopniach IB i IIA zarówno w grupie chorych na raka płaskonabłonkowego, jak i gruczołowego. Dokonano porównania ekspresji HER-2/neu w grupach chorych wyróżnionych na podstawie uznanych czynników prognostycznych, takich jak stopień klinicznego zaawansowania, typ histologiczny, obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, zajęcie przestrzeni naczyniowej i stopień uszkodzenia popromiennego nowotworu. Posługując się modelem Coksa, przeprowadzono wielowariantową analizę wpływu ocenianych czynników prognostycznych zarówno na przeżycia całkowite, jak i bezobjawowe. **Wyniki:** Pozytywną reakcję na HER-2/neu stwierdzono w 135 przypadkach (45,3%): w 23 przypadkach była to reakcja o dużym nasileniu – 3+ (7,8%), a w 41 przypadku o nasileniu średniego stopnia – 2+ (13,7%). W 163 przypadkach (54,7%) nie stwierdzono pozytywnej reakcji. Wyniki analizy przeżyć są następujące: prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia 5 lat dla całej grupy chorych wyniosło 90,9%, a 10 lat – 85,2%. Przedstawiono krzywą przeżycia całkowitego analizowanej grupy chorych. Prawdopodobieństwo przeżycia bez nawrotu choroby 5 i 10 lat wyniosło odpowiednio 83,3% i 82,3%. Istotny wpływ na 5- i 10-letnie przeżycia bezobjawowe miały: przerzuty do węzłów chłonnych i ich liczba, zajęcie przestrzeni naczyniowej, typ histologiczny i ekspresja HER-2/neu. W wyniku przeprowadzonej analizy Coksa wykazano istotny wpływ prognostyczny na ryzyko nawrotu lub zgonu takich czynników, jak: przerzuty do węzłów chłonnych i ilość zajętych węzłów, zajęcie przestrzeni naczyniowej, typ histologiczny i ekspresja HER-2/neu. Ryzyko nawrotu lub zgonu dla jednego zajętego węzła oraz dla większej liczby zajętych węzłów chłonnych jest 2,4 oraz 5,1 razy wyższe od odpowiedniego ryzyka dla węzłów niezajętych. Fakt zajęcia przestrzeni naczyniowej zwiększa niemal 3-krotnie ryzyko nawrotu lub zgonu. Dla raka płaskonabłonkowego ryzyko nawrotu lub zgonu stanowi 0,4 ryzyka niepowodzenia dla raka gruczołowego. Stwierdzenie silnej ekspresji HER-2/neu (2+, 3+) zwiększa 2,7 razy ryzyko niepowodzenia leczenia. **Wnioski:** Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji HER-2/neu w grupach chorych wyróżnionych na podstawie parametrów kliniczno-patologicznych (tj.: stopnia klinicznego zaawansowania, typu histologicznego, przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych i popromiennej sterylizacji szyjki macicy). Istotny wpływ statystyczny na przeżycia bezobjawowe miały następujące czynniki prognostyczne: typ histologiczny, przerzuty do węzłów chłonnych i ich liczba, inwazja przestrzeni naczyniowej oraz ekspresja TP53, BCL2 i HER-2/neu. Spośród wszystkich analizowanych czynników największy wpływ prognostyczny zarówno na przeżycia całkowite, jak i bezobjawowe miała obecność przerzutów do węzłów chłonnych miednicy.

Słowa kluczowe: rak szyjki macicy, czynniki prognostyczne, immunohistochemia, ekspresja HER-2/neu, prawdopodobieństwo przeżycia i zgonu

Содержание

Сверхвыразительность ХЭР-2/неу считается существенным прогностическим фактором, который может указать агрессивный клинический процесс многих новообразований, в том числе рак шейки матки. **Материал и метод:** Используя иммуногистохимический метод была проведена оценка выразительности ХЭР-2/неу у 298 больных, которые лечились в связи с раком шейки матки в степени IB и 2A как в группе больных страдающих раком плоскоэпителиальным, так и железистым. Проводилось сравнение выразительности ХЭР-2/неу в группах больных, которые отличались на основании признанных прогностических факторов, таких как степень клинического развития, гистологический тип, наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах, захват сосудистого пространства и степень пострadiационного повреждения новообразования. Используя модель Кокса был проведен многовариантный анализ влияния оцениваемых прогностических факторов как на полную продолжительность жизни, так и на жизнь без симптомов. **Результаты:** Положительная реакция на ХЭР-2/неу отмечена у 135 пациенток (45,3%): в 23 случаях это была реакция с большим напряжением – 3+ (7,8%), а в 41 случае с напряжением средней степени – 2+ (13,7%). В 163 случаях (54,7%) не была отмечена положительная реакция. Результаты анализа продолжительности жизни были следующие: вероятность полного проживания в течение 5 лет для всей группы больных составляла 90,9%, а 10 лет – 85,2%. Представлена кривая полной продолжительности жизни анализируемой группы больных. Вероятность проживания без рецидива болезни 5 и 10 лет составила соответственно 83,3% и 82,3%. Существенное влияние на 5- и 10-летнее проживание без симптомов имели: метастазы в лимфатических узлах и их количество, захват сосудистой поверхности, гистологический тип и выразительность ХЭР-2/неу. В результате проведенного анализа Кокса было отмечено существенное прогностическое влияние на риск рецидива или смерти таких факторов, как: метастазы в лимфатических узлах и количество занятых узлов, захват сосудистой поверхности, гистологический тип и выразительность ХЭР-2/неу. Риск рецидива или смерти при одном занятом узле или большом количестве занятых лимфатических узлов составлял 2,4 и 5,1 раза больше в сравнении с соответствующим риском для узлов, которые не были заняты. Факт занятия

сосудистой поверхности увеличивает почти в 3 раза риск рецидива или смерти. Для плоскоэпителиального рака риск рецидива или смерти составлял 0,4 риска неудачи в сравнении с железистым раком. Констатация сильной выразительности ХЭР-2/неу (2+, 3+) увеличивает 2,7 раза риск неудачи лечения. **Выводы:** Не отмечена статистически существенная разница в выразительности ХЭР-2/неу в группах больных, которые выделялись на основании клинических и патологических параметров, т.е. степени клинического развития, гистологического типа, метастазов в регионарных лимфатических узлах и пострадиационной стерилизации шейки матки. Существенное статистическое влияние на продолжение жизни без симптомов имели следующие прогностические факторы: гистологический тип метастазов в лимфатических узлах и их количество, занятие сосудистой поверхности и выразительность ТП53, БКЛ12 и ХЭР-2/неу. Из всех рассматриваемых факторов самое большое прогностическое влияние как на полное время жизни, так и на жизнь без симптомов имело наличие метастазов в лимфатических узлах таза.

Ключевые слова: рак шейки матки, прогностические факторы, иммуногистохимия, выразительность ХЭР-2/неу, вероятность продолжения жизни и смерти

INTRODUCTION

Cervical cancer is the second most common female genital neoplasm in Poland. Every year, about 3400 new cases of invasive cervical cancer are diagnosed and about 2200 women die thereof. Only about 25-30% of cases are detected at an early clinical stage (IB, IIA), when radical surgical treatment and radiotherapy ensure an 80% rate of 5-year survival⁽¹⁾. Prediction of future events, and particularly prediction of future consequences of present actions, is an age-long human desire. History of medicine shows us, that management of patients depends heavily on four key factors: diagnosis, treatment, prevention of recurrence and prognosis. Throughout centuries, general perception of a diagnosis of neoplasm was that of a direct threat to life and imminence of death. In an over 100-year-old history of modern oncology, a significant proportion of research has been devoted to the detection of significant prognostic factors in particular tumour types. At an early phase of research, prognostic role of such factors as primary tumour location and histological type became evident. Further studies and clinical experience demonstrated significant differences in clinical course of tumours identical as to type and location. Such observations focused the efforts of subsequent generations of investigators on other prognostic factors, which might influence therapeutic strategy and its outcome. Recent research revealed significant prognostic role of biomarkers, i.e. oncogenes, suppressor genes and metastasis markers. HER-2/neu (c-erbB2) is an oncogene belonging to the family of tyrosine kinase receptor and its expression is usually associated with an aggressive clinical course and poor prognosis in breast cancer patients⁽²⁾. Much less understood is the frequency of HER-2/neu expression and its prognostic role in tumours of other origin. Potti et al. noticed a minimal if not total lack of expression of this gene in neuroendocrine lung cancers, while non-small-cell lung cancers are usually associated with a pronounced HER-2/neu expression⁽³⁾.

WPROWADZENIE

Rak szyjki macicy (RSM) jest drugim pod względem częstości występowania nowotworem narządu rodnych kobiet w Polsce. Corocznie rozpoznawanych jest ok. 3400 nowych przypadków raka inwazyjnego szyjki macicy, a ok. 2200 kobiet umiera z jego powodu. Jedynie 25-30% przypadków rozpoznawanych jest we wczesnym stopniu klinicznego zaawansowania (IB i IIA), kiedy radykalne leczenie operacyjne i radioterapia zapewniają ok. 80% 5-letnich przeżyć⁽¹⁾. Przewidywanie przyszłości, a zwłaszcza przyszłych skutków prowadzonych działań, jest odwiecznym dążeniem ludzi. Historia medycyny wykazała, że w opiece nad chorym wyróżniają się cztery istotne elementy: rozpoznanie, leczenie, zapobieganie nawrotom i rokowania. Rozpoznanie choroby nowotworowej w percepcji ogólnej przez wieki wiązało się z bezpośrednim zagrożeniem życia, a nawet z nieuchronnością śmierci. W ponad 100-letniej historii nowoczesnej onkologii znaczna część wysiłku badawczego poświęcona była rozpoznaniu istotnych czynników prognostycznych w różnych typach nowotworów. We wczesnej fazie doświadczeń pozwoliła wykazać znaczenie prognostyczne lokalizacji pierwotnej nowotworu i typu histologicznego. Dalsze badania i obserwacje kliniczne wykazały zjawisko znacznie różniące się przebiegu klinicznego nowotworu o tej samej lokalizacji i typie histologicznym. Obserwacje te skoncentrowały uwagę kolejnych pokoleń badaczy na rozpoznaniu istotnych prognostycznie czynników wpływających na wybór metody leczenia i jego wynik. W ostatnich latach wykazano znaczenie prognostyczne biomarkerów, tj. onkogenów, genów supresorowych i markerów przerzutowania. HER-2/neu (c-erbB2) jest onkogenem należącym do rodziny receptora kinazy tyrozynowej, jego ekspresja najczęściej jest związana z agresywnym przebiegiem klinicznym i gorszym rokowaniem u chorych na raka piersi⁽²⁾. Znacznie gorzej znana jest częstość ekspresji HER-2/neu i jej znaczenie prognostyczne w nowotwo-

CLASSIFICATION OF PROGNOSTIC FACTORS

In almost general opinion, basic tumour features, i.e. histological type, depth of infiltration, degree of maturity, extent of invasion and presence of lymph node metastases, are correlated with prognosis. Nevertheless, several other factors, only indirectly associated with the tumor, may influence clinical course and prognosis. Thereof stems a generally accepted classification of prognostic factors into three main groups: tumour-dependent, patient-dependent and environment-dependent.

Tumour-dependent prognostic factors

1. Histology:
 - morphological classification (planoepithelial or adenomatous cancer);
 - degree of histological maturity (histological grading);
 - pattern of growth (papillomatous or solid);
 - pattern of invasion (perineural, invasion of blood and lymph vessels);
 - molecular features of tumour.
2. Anatomical features:
 - TNM classification; tumour size;
 - isolated or multiple tumour foci, distant metastases;
 - tumour markers.
3. Tumour biology:
 - tumour markers (HER-2/neu, CD44);
 - proliferation markers (Ki-67, MIB-1, S-phase fraction);
 - apoptosis markers (TP53, rb, BCL2);
4. Tumour-associated symptoms:
 - loss of body mass;
 - pain;
 - edema;
 - fever.
5. General condition of patient.

Patient-dependent prognostic factors

1. Demographic features:
 - age;
 - race;
 - gender;
 - socioeconomic status;
 - profession.
2. Coexisting diseases:
 - constant:
 - inherited syndromes of immune deficiency,
 - von Recklinghausen disease.

rach o innych lokalizacjach. Potti i wsp. stwierdzili minimalny, a nawet całkowity brak ekspresji tego genu w rakach neuroendokrynnych płuca, podczas gdy w rakach niedrobnokomórkowych obserwowano wysoki poziom ekspresji HER-2/neu⁽³⁾.

KLASYFIKACJA CZYNNIKÓW PROGNOSTYCZNYCH

Niemal powszechnie podstawowe cechy nowotworu, tj.: typ histologiczny, głębokość naciekania, stopień dojrzałości, głębokość inwazji i obecność przerzutów do węzłów chłonnych, utożsamiane są z rokowaniem. Należy jednak pamiętać, że istnieje szereg innych czynników niezwiązanych bezpośrednio z guzem, które mają wpływ na przebieg choroby i wynik leczenia. Stąd powszechnie akceptowany podział czynników prognostycznych na trzy podstawowe grupy: czynniki charakteryzujące guz, czynniki charakteryzujące gospodarza-pacjenta i czynniki środowiskowe.

Czynniki prognostyczne związane z guzem

1. Histopatologia:
 - klasyfikacja morfologiczna (rak płaskonabłonkowy/rak gruczołowy);
 - stopień dojrzałości histologicznej (grading);
 - typ rozrostu (np. brodawkowaty lub lity);
 - typ inwazji (np. okołonerwowy, inwazja naczyń krwionośnych lub chłonnych);
 - charakterystyka molekularna guza.
2. Cechy anatomiczne nowotworu:
 - klasyfikacja TNM, wielkość guza;
 - ognisko pojedyncze lub mnogie, przerzuty odległe;
 - markery nowotworowe.
3. Biologia nowotworu:
 - markery, biomarkery (HER-2/neu, CD44);
 - markery proliferacji (Ki-67, MIB-1, frakcja fazy S);
 - markery apoptozy (TP53, rb, BCL2).
4. Objawy związane z obecnością guza:
 - utrata wagi ciała;
 - ból;
 - obrzęk;
 - gorączka.
5. Stan ogólny.

Czynniki prognostyczne związane z gospodarzem-chorym

1. Czynniki demograficzne:
 - wiek;
 - rasa;
 - płeć;

- variable:
 - coexisting diseases (colitis, collagenosis),
 - body mass,
 - cardiovascular system performance,
 - acquired immune deficiency syndromes,
 - infections,
 - mental state.
3. Patient's cooperativeness and compliance:
- psychosocial response to tumour;
 - addictions (alcohol, tobacco, drugs);
 - belief in alternative therapies.

Environment-dependent prognostic factors

1. Doctor:

- general practitioner/specialist;
- quality of diagnostic work-up;
- precision of clinical staging;
- skill and experience.

2. Healthcare system:

- availability of adequate diagnostic facilities;
- availability of medical care:
 - waiting time,
 - distance to treating centre,
 - availability of free screening programs.

3. Socioeconomic factors:

- socioeconomic status;
- preference for non-conventional therapies;
- availability of specialized medical centres.

MATERIAL AND METHODS

The subject of detailed analysis was a group of 298 women with stage IB-IIA cervical cancer treated at the Department of Female Genital Neoplasms since 1985 thru 2000. In all cases, tumour diagnosis has been confirmed by microscopic examination. Staging was made based on a synthesis of clinical data obtained after vaginal and rectal examination, lung X-ray, ultrasonography and, in selected cases, computed tomography and magnetic resonance imaging. The patients' median age was 52 years (range: 21-79 years). All patients underwent radical Wertheim-Meigs hysterectomy with adnexectomy. The scope of lymphadenectomy encompassed elective excision of iliac and obturator lymph nodes down to the level of bifurcation of the common iliac artery. Some patients received neoadjuvant brachytherapy prior to surgery using Cs¹³⁷ in two fractions up to a total dose of 45-50 Gy measured in the reference point A. Surgical procedure of the above-mentioned type was performed 6-8 weeks after completion of brachytherapy. Surgical specimens underwent detailed microscopic study, performed at the Department of Pathology of the Maria Skłodowska-Curie Institute of

- status socjoekonomiczny;
- religia.

2. Choroby współistniejące:

- stałe:
 - dziedziczne zespoły upośledzonej wydolności układu immunologicznego,
 - choroba Recklinghausena;
- zmienne:
 - choroby współistniejące (np. zapalenie jelit, kolagenozy),
 - waga ciała,
 - wydolność układu krążenia,
 - nabyte zespoły upośledzenia układu immunologicznego,
 - infekcje,
 - stan psychiczny.

3. Współpraca ze strony pacjenta:

- psychospołeczna reakcja na nowotwór;
- wpływ nałogów (alkohol, palenie, narkotyki);
- wiara w terapie alternatywne.

Czynniki prognostyczne związane z otoczeniem chorego

1. Lekarz:

- lekarz ogólny/specjalista;
- jakość diagnostyki;
- dokładność stajingu;
- umiejętności wysokospecjalistyczne.

2. System opieki zdrowotnej:

- dostępność do odpowiedniej diagnostyki;
- dostępność do opieki medycznej:
 - czas oczekiwania,
 - odległość do ośrodka leczniczego,
 - dostępność do bezpłatnych programów skriningowych.

3. Czynniki socjospołeczne:

- stan socjoekonomiczny;
- preferencje dla terapii niekonwencjonalnej;
- dostęp do specjalistycznych ośrodków medycznych.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem szczegółowej analizy była grupa 298 kobiet chorych na raka szyjki macicy w stopniach klinicznego zaawansowania IB-IIA leczonych w Klinice Nowotworów Narządów Płciowych Kobięcych w latach 1985-2000. We wszystkich przypadkach rozpoznanie nowotworu potwierdzone było badaniem mikroskopowym. Ustalenie stopnia zaawansowania dokonywało się w wyniku syntezy danych klinicznych uzyskanych po badaniach klinicznych *per vaginam* i *per rectum* oraz badań obrazowych RTG płuc, ultrasonografii, a w szcze-

Oncology in Warsaw, Poland, according the internal standards of the Institute and to WHO recommendations. Microscopic study determined the following parameters:

1. extent of infiltration in 2 dimensions;
2. histological type;
3. histological maturity (grade);
4. invasion of vascular space;
5. presence of microscopic tumour foci in the parametrial tissue and positive surgical margin;
6. presence of lymph node metastases and their numbers;
7. degree of radiation-induced destruction of cervical infiltration.

Presence of lymph node metastases, microscopic tumour foci in parametrial tissue, positive surgical margin and low histological maturity (high malignancy grade G3) were considered an indication for teloradiotherapy. Patients were irradiated on the pelvic area using the 4-field box technique and using 4-15 MeV photons or a Co⁶⁰ up to a total dose of 46-50 Gy. Upon completion of treatment protocol, the patients were followed-up on an outpatient basis for 5-15 years (median: 11.6 years). The patients who began treatment by preoperative brachytherapy were assessed as to the degree of tumour destruction by ionising radiation, using a system of evaluation of effectiveness of radiotherapy according to the degree of regression of cervical tumour infiltration. All cases underwent histopathological assessment using a routine hematoxylin-eosin stained preparations. Tissue samples collected from the cervix and designed for light-microscopy and immunohistochemical staining, were fixed for 24-48 hours in 4% buffered formalin and after routine processing in tissue processor was embedded in paraffin blocks. Studies were performed using tissue slices 4-5 µm thick. Upon completion initial evaluation, the following biomarkers were tested: Ki-67, TP53, BCL2, HER-2/neu, CD44, TIMP-2 and MMP-2.

METHODOLOGY OF IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDIES

Identification of selected cellular markers was performed using the following antibodies:

- TIMP-2 – tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2;
- MMP-2 – matrix metalloproteinase 2.

Reactivity of antibodies in paraffin slices was demonstrated using a visualization kit (DAKO EnVison™ +

gólnym przypadku również tomografii komputerowej i rezonansu magnetycznego. Wiek chorych w analizowanej grupie wynosił od 21 do 79 lat (mediana – 52 lata). U wszystkich chorych przeprowadzono leczenie polegające na radykalnym wycięciu macicy z przydatkami sposobem Wertheima-Meigsa. Zakres wykonywanej limfadenektomii obejmował elektywne usunięcie węzłów chłonnych biodrowych i zasłonowych do poziomu podziału tętnicy biodrowej wspólnej. U części chorych jako pierwszy etap leczenia przeprowadzono przedoperacyjną brachyterapię Cs¹³⁷ LDR w dwóch frakcjach w dawce łącznej mierzonej w punkcie referencyjnym A wynoszącej 45-50 Gy. Operacje o zakresie opisanym wyżej wykonywano w okresie 6-8 tygodni od zakończenia brachyterapii. Materiał operacyjny poddawany był szczegółowemu badaniu mikroskopowemu. Badanie mikroskopowe przeprowadzane w Zakładzie Patologii Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie zgodnie ze standardami instytucji i z zasadami zaleceń WHO. Badaniem mikroskopowym określano następujące parametry:

1. rozmiar nacieków w dwóch wymiarach;
2. typ histologiczny;
3. stopień dojrzałości histologicznej;
4. zajęcie przestrzeni naczyniowej;
5. obecność mikroskopowych nacieków przymaciczy i pozytywny margines chirurgiczny;
6. obecność przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych z określeniem ilości;
7. stopień uszkodzenia popromiennego nacieku szyjki macicy.

Stwierdzenie obecności przerzutów do węzłów chłonnych, mikroskopowych nacieków przymaciczy, pozytywnego marginesu chirurgicznego, a także niskiego stopnia dojrzałości histologicznej (G3) stanowiło wskazanie do uzupełniającej teloradioterapii. Chore napromieniano na obszar miednicy techniką czterech pól *box*, fotonami 4-15 MeV lub bombą kobaltową w łącznej dawce 46-50 Gy. Po zakończeniu leczenia chore odbywały badania kontrolne, okres obserwacji po leczeniu wynosił od 5 do 15 lat (mediana – 11,6 roku).

U chorych, które rozpoczęły leczenie od przedoperacyjnej brachyterapii, dodatkowo oceniono stopień uszkodzenia nowotworu przez promieniowanie jonizujące, posługując się systemem oceny skuteczności napromieniania według stopnia regresji nacieku szyjki macicy.

Wszystkie przypadki były oceniane histopatologicznie na podstawie rutynowo przygotowanych preparatów bar-

Antibody Przeciwciało	Clone Klon	Manufacturer Firma	Catalogue number Nr katalogowy	Titre Rozcieńczenie
HER-2/neu	Polyclonal Poliklonalne	DAKO	M0485	1:300

Table 1. Antibody used for assessment of expression of biological markers analysed
Tabela 1. Przeciwciało użyte do oceny ekspresji badanych markerów biologicznych

Peroxidase; Mouse, catalogue number K4007; Rabbit, catalogue number K4011). Immunohistochemical staining was performed according to the manufacturer's recommendations, at room temperature in a wet chamber. Paraffin slices 4-5 µm thick were placed on silanised glass, deparaffined and hydrated (xylene, ethyl alcohol 96%, ethyl alcohol 70%, water) and subjected to subsequent staining phases:

1. Retrieval of antigens at high temperature or heating in a water bath at 95-99°C in a Tris-EDTA buffer (pH 9.0, Target Retrieval Solution S2367, DAKO) for 30 minutes.
2. Inhibition of endogenous peroxidase. Incubation for 5 minutes in 3% hydrogen peroxide. Preparations were flushed twice with distilled water and immersed in a TBS buffer (pH 7.6; 0.05 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl).
3. Incubation with specific antigen or control reagent for 60 minutes. Antibodies were diluted with a TBS buffer pH 7.6 with 1% bovine albumin (SIGMA, catalogue number A9647). Negative reagent control was provided by immunoglobulin fraction of normal murine or rabbit serum. Preparations were flushed with TBS solution (pH 7.6) for 5 minutes.
4. Incubation with visualizing reagent for 30 minutes. This reagent contains peroxidase-labeled dextran polymer (Px), conjugated with anti-mice and anti-rabbit goat immunoglobulins. Preparations were flushed with TBS solution (pH 7.6) for 5 minutes.
5. Triggering of chromatic reaction. Peroxidase was localized using a buffered substrate solution (pH 7.5) containing less than 0.1% of hydrogen peroxide, chromogen: DAB (5% solution of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride), substrate: hydrogen peroxide and chromogen: diaminobenzidine solution (DAKO DAB+, catalogue number K3468). Reaction time was 2-5 minutes; intensity of pigmentation was monitored by light microscopy. Preparations were flushed in tap water for 5 minutes.
6. Hematoxylin staining. Cell nuclei were stained with hematoxylin (2-3 minutes). Preparations were differentiated in 1% hydrochloric acid and 70% ethanol

wionych hematoksyliną i eozyną. Materiał tkankowy pochodzący z szyjki macicy, a przeznaczony do badań w mikroskopie świetlnym i barwień immunohistochemicznych utrwalany był przez 24-48 godzin w zbufoowanej 4% formalinie i po rutynowej obróbce w procesorze tkankowym zatapiany w bloczkach parafinowych. Do badań wykorzystano skrawki tkankowe grubości 4-5 µm. Po wykonaniu serii oznaczeń wstępnych przeprowadzono oznaczenia następujących biomarkerów: Ki-67, TP53, BCL2, HER-2/neu, CD44, TIMP-2 i MMP-2.

METODOLOGIA BADAŃ IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH

Do identyfikacji wybranych markerów komórkowych zastosowano następujące przeciwciała:

- TIMP-2 – *tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2*;
- MMP-2 – *matrix metalloproteinase 2*.

Reaktywność przeciwciał w skrawkach parafinowych wykazywano za pomocą zestawu wizualizacyjnego DAKO EnVision (EnVision™ + Proxidase; Mouse, numer katalogowy K4007; Rabbit, numer katalogowy K4011). Barwienia immunohistochemiczne wykonano zgodnie z procedurą firmy, w temperaturze pokojowej, w komorze wilgotnej.

Skrawki parafinowe grubości 4-5 µm umieszczone na szkiełkach silanizowanych odparafinowywano i uwadnianio (ksylen, alkohol etylowy 96%, alkohol etylowy 70%, woda), a następnie poddawano kolejnym etapom barwienia:

1. Odzyskiwanie antygenów w wysokiej temperaturze lub ogrzewanie w łaźni wodnej w temperaturze 95-99°C w buforze Tris-EDTA pH 9,0 (Target Retrieval Solution S2367, DAKO) przez 30 minut.
2. Blokowanie endogennej peroksydazy. Inkubacja w 3% nadtlenu wodoru – 5 minut. Preparaty płukano 2-krotnie wodą destylowaną i umieszczano w buforze TBS pH 7,6 (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl).
3. Inkubacja ze specyficznym przeciwciałem lub odczynnikiem kontrolnym – 60 minut. Przeciwciała rozcieńczano buforem TBS pH 7,6 z dodatkiem 1% albuminy bydlęcej (SIGMA, numer katalogowy A9647).

Antibody Przeciwciała	Positive control Kontrola pozytywna	Localization of reaction Lokalizacja reakcji
c-erbB2 oncoprotein c-erbB2 onkoproteiny	Cells of invasive breast cancer with previously demonstrated* moderate (2+) overexpression of HER-2/neu protein Komórki inwazyjnego raka przewodowego piersi z uprzednio wykazaną* nadekspresją białka HER-2/neu średniego stopnia (2+)	Cell membrane Błona komórkowa
* HerceptTest (DAKO)		

Table 2. Types of immunohistochemical reaction controls
Tabela 2. Typy kontroli reakcji immunohistochemicznych

and were next flushed in tap water. After dehydration (ethanol 99.8%, ethanol 96%, xylene, in this sequence), preparations were embedded in a medium (Consul-Mount, Shandon).

In the process of preparation and assessment of immunohistochemical staining, a positive tissue control was used, according to manufacturer's recommendations (table 2). An additional tissue control, containing antigens analysed, was provided by selected samples containing cervical cancer tissue, fixed and prepared in the same way as samples obtained from study population. Areas of samples examined devoid of antigens being analyzed provided internal negative tissue control.

ASSESSMENT OF CHROMATIC REACTIONS

HER-2/neu expression was assessed based on chromatic reaction visible in tumour cell membranes, according to FDA guidelines concerning immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in breast cancer. Intensity of reaction was assessed using an analog scale 0-3+, where 0 signified total lack of membrane reaction or reaction present in less than 10% of cells, 1+ – partial, weak staining of membranes in more than 10% of cells, 2+ – moderate intensity of coloration of all membranes in more than 10% of cells, 3+ – intense coloration of all membranes in over 10% of cells studied.

STATISTICAL ANALYSIS

The aim of statistical analysis was to assess prognostic value of selected tumour markers. The endpoint adopted was overall survival time and recurrence-free survival time. The former was measured since surgery to death of any cause and the latter – from surgery to first recurrence or death of any cause. Survival time was calculated using the Kaplan-Meier method⁽⁴⁾ and follow-up time was estimated by the inverse Kaplan-Meier method⁽⁴⁾.

Analysis of prognostic factors was performed using the Cox proportional risk model⁽⁵⁾. The model was constructed using the method of stepwise elimination of variables, based on classic prognostic factors, e.g. FIGO clinical stage, tumour size, histological type, number of lymph node metastases, vascular space invasion and microscopic tumour foci in the parametrial tissues. Standard criteria for inclusion and exclusion of variables were adopted: $p=0.05$ and $p=0.1$. Upon adjustment, the model was used to test prognostic value of the following markers: TP53, BCL2, CD44, MIB-1, MMP-2 and TIMP-2. Assumption of proportional risk function was verified by graphic method. For all tests, the threshold of statistical significance was set at $\alpha = 0.05$.

In addition, mutual correlation of prognostic factors was tested, e.g. clinical stage, lymph node status, histo-

Odczynnikową kontrolę negatywną stanowiła frakcja immunoglobulinowa normalnej surowicy mysiej lub króliczej. Preparaty płukano roztworem TBS pH 7,6 przez 5 minut.

4. Inkubacja z odczynnikiem wizualizacyjnym (30 minut). Odczynnik ten zawiera polimer dekstranu znakowany peroksydazą (Px) skoniugowany z antymysimi lub antykróliczymi immunoglobulinami kozimi. Preparaty płukano roztworem TBS pH 7,6 przez 5 minut.
5. Wywoływanie reakcji barwnej. Peroksydazę lokalizowano, stosując roztwór buforowany substratu o pH 7,5 zawierający mniej niż 0,1% nadtlenu wodoru oraz jako chromogen DAB – 5% roztwór czterochlorowodoru 3,3'-diaminobenzzydiny, jako substrat – wodę utlenioną, zaś jako chromogen – roztwór diaminobenzzydiny (DAKO DAB+, numer katalogowy K3468). Czas reakcji wyniósł 2-5 minut; stopień intensywności zabarwienia monitorowano w mikroskopie świetlnym. Preparaty płukano w wodzie bieżącej przez 5 minut.
6. Barwienie hematoksyliną. Jądra komórkowe barwiono hematoksyliną (2-3 minut). Preparaty różnicowano w 1% kwasie solnym i w 70% alkoholu etylowym, a następnie płukano w wodzie bieżącej. Po odwodnieniu (kolejno: alkohol etylowy 99,8%, alkohol etylowy 96%, ksylen) preparaty zatapiało w medium (Consul-Mount, Shandon).

W procesie przygotowania i oceny barwień immunohistochemicznych zastosowano tkankową kontrolę pozytywną zgodnie z zaleceniami producentów przeciwciał (tabela 2). Dodatkową kontrolę tkankową zawierającą badane antygeny stanowiły wybrane wycinki zawierające utkanie raka szyjki macicy, utrwalone i przygotowane w taki sam sposób jak materiał tkankowy pacjentów z grupy badanej. Wewnętrzną ujemną kontrolę tkankową stanowiły obszary badanych skrawków niezawierające badanych antygenów.

OCENA REAKCJI BARWNYCH

HER-2/neu – ocenie poddawano reakcję barwną widoczną w błonach komórek nowotworowych. Przy ocenie posługiwano się wytycznymi FDA dotyczącymi oceny immunohistochemicznej ekspresji białka HER-2/neu w raku piersi. Intensywność reakcji oceniano w skali od 0 do 3+, gdzie 0 oznaczało brak reakcji błonowej lub reakcję błonową widoczną w mniej niż 10% badanych komórek, 1+ – częściowe, słabe zabarwienie błon komórkowych w więcej niż 10% badanych komórek, 2+ – miernej intensywności zabarwienie wszystkich błon komórkowych obserwowane w ponad 10% badanych komórek, 3+ – intensywne zabarwienie wszystkich błon komórkowych widoczne w ponad 10% badanych komórek.

logical type, quality of cervical sterilization and markers TP53, BCL2, CD44, MIB-1, MMP-2 and TIMP-2. To this purpose the independence χ^2 test was used. In the case of markers whose expression was expressed by an ordinate variable, where the number of levels was superior than 2, an additional trend test was performed. Due to an increased risk of type I error caused by multiple testing, significance level α has been reduced to 0.01.

RESULTS

The patients' age ranged from 24 to 73 years (median 56). Among the 298 cases analysed, planoepithelial cancer

METODY STATYSTYCZNE

Celem analizy statystycznej była ocena wartości prognostycznej wybranych markerów nowotworowych. Jako kryterium oceny przyjęto czas przeżycia całkowitego oraz czas przeżycia do nawrotu choroby. Czas przeżycia mierzony był od operacji do zgonu z jakiegokolwiek powodu, a czas przeżycia bez nawrotu choroby – od operacji do pierwszego nawrotu choroby lub zgonu. Czas przeżycia obliczano metodą Kaplana-Meiera⁽⁴⁾, a czas obserwacji oszacowano odwrotną metodą Kaplana-Meiera⁽⁴⁾. Analizę czynników prognostycznych przeprowadzono, posługując się modelem proporcjonalnego ryzyka

	N=298	%
Clinical stage <i>Stopień kliniczny</i>		
IB	269	90.3
IIA	29	9.7
Tumour diameter <i>Wielkość guza</i>		
≤4 cm	195	65.4
>4 cm	103	34.6
Histopathology <i>Histopatologia</i>		
<i>Ca plano</i>	267	89.6
<i>Adenoca</i>	25	8.4
Other	6	2.0
<i>Inne</i>		
Grading		
G1	86	28.8
G2	141	47.3
G3	71	23.9
Number of lymph nodes invaded <i>Liczba zajętych węzłów</i>		
0	244	81.9
1	29	9.7
>1	25	8.4
Vascular space invasion <i>ZPN</i>		
0	272	91.3
1	26	8.7
Microscopic parametrial foci <i>MNP</i>		
0	277	93.0
1	21	7.0
Radiation-induced cervix sterilization <i>Sterył</i>		
0	105	35.4
1	192	64.6
Lack of data <i>Brak danych</i>	1	

Table 3. Basic clinical-pathological parameters in the study population

Tabela 3. Podstawowe parametry kliniczno-patologiczne analizowanej grupy chorych

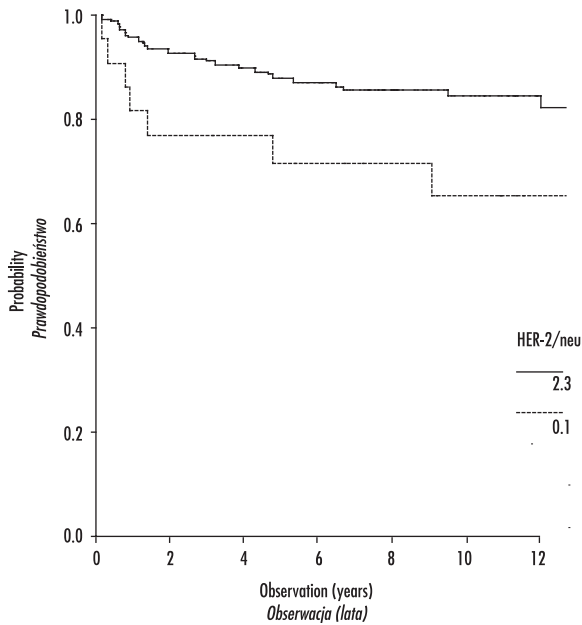


Fig. 1. Recurrence-free survival curves depending on HER-2/neu gene expression

Rys. 1. Krzywa przeżycia bez nawrotu choroby w zależności od ekspresji genu HER-2/neu

was diagnosed in 267 patients (89.6%) and adenomatous cancer – in the remaining 31 cases (10.4%). Tumours of moderate maturity grade were most frequent and were seen in 194 patients (65.1%). Highly mature and immature tumours were encountered in 86 cases (28.8%) and in 71 cases (23.9%), respectively. Moderately mature tumours were seen most often and were diagnosed in 141 cases (47.3%). Distribution of clinical stages was the following: stage IB was seen in 269 patients (90.3%), stage IIA – in 29 patients (9.7%). Tumours under 4 cm in diameter were present in 195 patients (65.4%) and over 4 cm – in 103 patients (34.6%); pelvic lymph node metastases were detected in 54 patients (18.1%). The frequency of other classic (histopathological) prognostic factors was the following: vascular space invasion – 26 patients (8.7%), microscopic parametrial infiltrate – 21 patients (7.0%), radiation-induced cervix sterilization – 192 patients (64.6%). Basic clinical-pathological data are presented in table 3.

Coksa⁽⁵⁾. Model zbudowano metodą krokowej eliminacji zmiennych w oparciu o klasyczne czynniki prognostyczne, tj.: stopień klinicznego zaawansowania FIGO, wielkość guza, typ histopatologiczny, liczbę zajętych węzłów chłonnych, zajęcie przestrzeni naczyniowej (ZPN), mikroskopowy naciek przymacicza (MNP). Przyjęto standardowe warunki włączenia i wyłączenia zmiennych: $p=0,05$ i $p=0,1$. Po dopasowaniu model wykorzystano do testowania wartości prognostycznej następujących markerów: TP53, BCL2, CD44, MIB-1, MMP-2, TIMP-2. Założenie proporcjonalności funkcji ryzyka weryfikowano metodą graficzną. Dla wszystkich testów przyjęto poziom istotności statystycznej α równy 0,05. Dodatkowo zbadano wzajemną zależność czynników prognostycznych, takich jak stopień zaawansowania, stan węzłów chłonnych, typ histologiczny, oraz stan sterylizacji szyjki i badanych markerów: TP53, BCL2, CD44, MIB-1, MMP-2, TIMP-2. W tym celu posłużono się testem niezależności χ^2 . W przypadku markerów, dla których ekspresja wyrażona była za pomocą zmiennej porządkowej o większej od dwóch liczbie poziomów, zastosowano dodatkowo test na trend. Ze względu na zwiększone ryzyko błędu I rodzaju spowodowane wielokrotnym testowaniem poziom istotności α obniżono do 0,01.

WYNIKI

Wiek chorych wynosił od 24 do 73 lat (mediana – 56 lat). Spośród poddanych analizie 298 przypadków raka płaskonabłonkowego rozpoznano u 267 chorych (89,6%), raka gruczołowego – w pozostałych 31 przypadkach (10,4%). Nowotwór o średnim stopniu dojrzałości był najczęstszą odmianą, stwierdzono go u 194 chorych (65,1%). Nowotwór o wysokim i niskim stopniu dojrzałości rozpoznano odpowiednio u 86 (28,8%) i 71 (23,9%) chorych. Najczęstszy był nowotwór o średnim stopniu dojrzałości, rozpoznano go w 141 przypadkach (47,3%). Rozkład stopni klinicznego zaawansowania przedstawiał się następująco: stopień zaawansowania IB rozpoznano u 269 chorych (90,3%), stopień IIA – u 29 chorych (9,7%). Guz o średnicy do 4 cm stwierdzono w 195 przypadkach (65,4%), a o średnicy powyżej 4 cm – w 103 przypadkach (34,6%), natomiast przerzuty do węzłów chłonnych miednicy – u 54 chorych (18,1%).

HER-2/neu	Number of patients Liczba przypadków	%
0	163	54.7
1	71	23.8
2	41	13.7
3	23	7.8

Table 4. Results of assessment of HER-2/neu expression

Tabela 4. Wyniki oceny ekspresji biomarkera HER-2/neu

	%*	HER-2/neu p**
IB	8.9	0.055
IIA	21.7	NS
N (-)	9.7	0.761
N (+)	15	NS
<i>Ca plano</i>	9.9	0.644
<i>Other</i>	13.0	NS
<i>Inne</i>		
<i>Sterył (-)</i>	8.2	0.628
<i>Sterył (+)</i>	11.4	NS

* Proportion of positive expression of biomarker analysed
Odsetek pozytywnej ekspresji badanego biomarkera
 ** Statistical significance level p=0.01
Poziom istotności statystycznej p=0,01

Table 5. Expression of HER-2/neu in principal prognostic groups

Tabela 5. Ekspresja HER-2/neu w podstawowych grupach prognostycznych

RESULTS OF ASSESSMENT OF HER-2/neu EXPRESSION

Positive HER-2/neu reaction was noticed in 135 cases (45.3%), thereof in 23 cases (7.8%) the reaction was intense (3+), in 41 cases (13.7%) it was moderate (2+). In 163 cases (54.7%) no positive reaction was noticed.

ANALYSIS OF SURVIVAL

Analysis of influence of prognostic parameters studied on 5- and 10-year symptom-free survival rates revealed a significant predictive role of the following: presence and number of lymph node metastases, vascular space invasion, histological type and HER-2/neu expression (fig. 1). Probability of 5- and 10-year recurrence-free survival is presented by survival curves in fig. 1 and in the table 6.

RESULTS OF MULTIVARIATE COX ANALYSIS

Parameters of Cox model influencing risk of recurrence and death are presented in table 7. Analysis performed revealed a significant prognostic value of the following factors concerning the risk of recurrence and/or death: presence and number of lymph node metastases, invasion of vascular space, histological type and HER-2/neu expression.

The risk of recurrence or death with one or several invaded lymph nodes is 2.4-fold and 5.1-fold higher than respective risk for non-invaded nodes. The fact of vascular space invasion increases almost 3-fold the risk of recurrence or death. In the case of planoepithelial cancer, the risk of recurrence or death is 0.4-fold that of therapeutic failure with adenomatous cancer. Strong

Częstość występowania pozostałych klasycznych czynników prognostycznych – histopatologicznych – przedstawiała się następująco: zajęcie przestrzeni naczyniowej (ZPN) rozpoznano u 26 chorych (8,7%), mikroskopowe nacieki przymaciczy (MNP) – u 21 chorych (7,0%), a sterylizację popromienną szyjki macicy – u 192 chorych (64,6%). Podstawowe dane kliniczno-patologiczne przedstawia tabela 3.

WYNIKI OCENY EKSPRESJI BIOMARKERA HER-2/neu

Pozytywną reakcję na HER-2/neu stwierdzono w 135 przypadkach (45,3%): w 23 przypadkach była to reakcja o dużym nasileniu – 3+ (7,8%), a w 41 przypadkach średniego stopnia – 2+ (13,7%). W 163 przypadkach (54,7%) nie stwierdzono pozytywnej reakcji.

ANALIZA PRZEŻYĆ

W wyniku przeprowadzonej analizy wpływu badanych parametrów prognostycznych na 5- i 10-letnie przeżycia bezobjawowe wykazano, że istotny wpływ prognostyczny miały: przerzuty do węzłów chłonnych i ich liczba, zajęcie przestrzeni naczyniowej, typ histologiczny, ekspresja HER-2/neu (rys. 1). Prawdopodobieństwo przeżyć 5 i 10 lat bez nawrotu choroby przedstawiają krzywa przeżycia oraz tabela 6.

WYNIKI ANALIZY WIELOCZYNNIKOWEJ COKSA

Parametry modelu Coksa wpływające na ryzyko wznowy i zgonu przedstawia tabela 7. W wyniku przeprowadzonej analizy wykazano istotny wpływ prognostyczny na

	Recurrence-free survival <i>Przeżycie bez nawrotu choroby</i>			
	5 years <i>5 lat</i>		10 years <i>10 lat</i>	
	Probability <i>Prawdopodobieństwo</i>	Standard error <i>Błąd standardowy</i>	Probability <i>Prawdopodobieństwo</i>	Standard error <i>Błąd standardowy</i>
HER-2/neu 0, 1 2, 3	0.8803 0.7187	0.0246 0.0979	0.8457 0.6534	0.0294 0.1086

Table 6. Probability of 5- and 10-year recurrence-free survival for statistically significant prognostic factors

Tabela 6. Prawdopodobieństwo przeżycia bez nawrotu 5 i 10 lat dla czynników rokowniczych istotnych statystycznie

HER-2/neu expression (2+, 3+) increases 2.7-fold the risk of therapeutic failure.

DISCUSSION

In spite of a decrease of incidence of invasive cervical cancer reported in the last decades, this neoplasm is still one of the most common female genital malignancies in Poland⁽¹⁾. According to the newest 2004 data, there are about 3400 new cases of cervical cancer every year and 1800 women die due to this malignancy⁽¹⁾. In Poland, incidence and mortality rates associated with cervical cancer are 3- to 4-fold higher than corresponding epidemiological coefficients reported in countries where population-oriented screening programs were realized during the last few decades⁽⁶⁾. Particularly disturbing is a high mortality associated with cervical cancer. The main cause of high mortality is an unfavourable distribution of clinical stages at diagnosis. In the clinical material of Institute of Oncology about 65-70% of cases are diagnosed at stages IIB-IIIIB⁽⁶⁾. In such cases, 5-year overall survival rates are 50% and 30%, respectively. Early forms of invasive cervical cancer (IB and IIA) make up for about 30% of newly diagnosed cases

ryzyko nawrotu lub zgonu: przerzutów do węzłów chłonnych i ilości zajętych węzłów, zajęcia przestrzeni naczyniowej, typu histologicznego, ekspresji HER-2/neu.

Ryzyko nawrotu lub zgonu dla jednego zajętego węzła oraz dla większej liczby zajętych węzłów chłonnych jest 2,4 oraz 5,1 razy wyższe od odpowiedniego ryzyka dla węzłów niezajętych. Fakt zajęcia przestrzeni naczyniowej zwiększa niemal 3-krotnie ryzyko nawrotu lub zgonu. Dla raka płaskonabłonkowego ryzyko nawrotu lub zgonu stanowi 0,4 ryzyka niepowodzenia dla raka gruczołowego. Stwierdzenie silnej ekspresji HER-2/neu (2+, 3+) zwiększa 2,7 razy ryzyko niepowodzenia leczenia.

OMÓWIENIE

Mimo stwierdzonego w ostatnich dekadach spadku zapadalności na inwazyjnego RSM nowotwór ten jest nadal jednym z częstszych nowotworów narządów płciowych kobiecych w populacji kobiet w Polsce⁽¹⁾. Według najnowszych danych w 2004 roku w Polsce na RSM zachorowało ok. 3400 kobiet, a 1800 zmarło z powodu tego nowotworu⁽¹⁾. Współczynniki zapadalności i umieralności na RSM w Polsce są 3-, 4-krotnie wyższe od podstawowych współczynników epidemiologicznych ob-

	Coefficient B <i>Współczynnik B</i>	Standard error <i>Błąd standardowy</i>	p	Relative risk <i>Ryzyko względne</i>
Model with HER-2/neu factor <i>Model z czynnikiem HER-2/neu</i>				
Number of lymph nodes invaded (>1/0) <i>Liczba zajętych węzłów chłonnych (>1/0)</i>	0.712 1.454	0.508 0.457	0.161 0.001	2.037 4.282
Invasion of vascular space (yes/no) <i>ZPN (tak/nie)</i>	1.125	0.453	0.013	3.080
Ca plano/other <i>Ca plano/inne</i>	-0.945	0.470	0.044	0.389
HER-2/neu (2, 3/0, 1)	0.986	0.445	0.027	2.680

Table 7. Parameters of Cox model for factors influencing the risk of recurrence or death

Tabela 7. Parametry modelu dla czynników wpływających na ryzyko nawrotu lub zgonu

and overall survival rate in this prognostically most favourable group of patients is about 80%. Analysis of treatment outcomes in patients presenting with an early stage of invasive cervical cancer established a subpopulation of patients with poor prognosis. For many years we are aware of predictive value of such important tumour-dependent factors as clinical stage, tumor size, histological type, histological grade, depth of stromal infiltration, invasion of vascular space, lymph node metastases and quality of surgical margin^(7,8). Prognostic value of the above-mentioned factors has been documented by many studies assessing their impact on survival and risk of recurrence^(7,8).

Follow-up of patients treated for cervical cancer confirmed the occurrence of recurrences and therapeutic failures also in groups of women not burdened by unfavourable prognostic factors. In the last few years, in parallel with development of molecular biology, we are witnessing an increasing interest in prognostic value of biological markers, such as oncogenes and suppressor genes^(9,10). As distant metastases, both to lymph nodes and parenchymal organs, constitute a significant proportion of therapeutic failures in the management of cervical cancer, research effort focused on understanding of mechanisms underlying development of metastases and use of expression of proteins participating in the process, particularly proteinases and growth factors, as markers of metastasis formation⁽¹¹⁻¹³⁾.

Immunohistochemical techniques are most widely used in studies on usefulness of predictive role biomarkers in cervical cancer. They served to assess expression of oncogenes, growth factors, suppressor genes and proliferation markers.

HER-2/neu (c-erbB2) is an oncogene belonging to the family of tyrosine kinase receptor and its expression is usually associated with aggressive clinical course and worse prognosis in breast cancer patients⁽²⁾. Much less understood are correlations of level of HER-2/neu expression and their prognostic significance in tumours of other locations. Potti et al. noticed a minimal, or even none expression of this gene in neuroendocrine lung tumours, while non-small-cell tumours an elevated HER-2/neu expression has been noticed⁽³⁾. Extremely interesting results were obtained when analysing HER-2/neu expression in small-cell neuroendocrine tumours. Gugger et al. noticed HER-2/neu expression in all subtypes of neuroendocrine tumours⁽¹⁴⁾. These investigators noticed a decreased expression in clinically aggressive forms of this tumour. Only about 9% of large-cell neuroendocrine tumours and 7% of small-cell tumours showed HER-2/neu expression, while it was present in 40-50% of carcinoid cases. Contradictory results were obtained by Potti et al.⁽³⁾ In their experience, both overall and symptom-free survival rates were significantly worse in groups of patients with a positive immunohistochemical reaction to HER-2/neu as compared with the group of patients

serwowanych w krajach, w których przez ostatnie dziesięciolecie prowadzono populacyjne badania przesiewowe⁽⁶⁾. Szczególnie niepokoi wysoka śmiertelność z powodu RSM, której główną przyczyną jest niekorzystny rozkład stopni klinicznego zaawansowania RSM. W materiale klinicznym COI w Warszawie ok. 65-70% przypadków to nowotwór w IIB i IIIB stopniu klinicznego zaawansowania⁽⁶⁾. W przypadkach tych odsetek 5-letnich przeżyć wynosi średnio ok. 50% i 30%. Wczesne postacie inwazyjnego RSM – stopnie IB i IIA stanowią ok. 30% leczonych, a odsetek 5-letnich przeżyć w tej rokowniczo korzystniejszej grupie chorych wynosi ok. 80%. Analiza wyników leczenia chorych na wczesne postacie inwazyjnego RSM pozwala wyróżnić subpopulację chorych ze złym rokowaniem. Od lat znane jest znaczenie prognostyczne tak istotnych czynników charakteryzujących nowotwór, jak: stopień klinicznego zaawansowania, wielkość guza, typ histologiczny, stopień dojrzałości histologicznej, głębokość naciekania zrębu, zajęcie przestrzeni naczyniowej, przerzuty do węzłów chłonnych i margines chirurgiczny^(7,8). Znaczenie prognostyczne powyższych czynników udokumentowane zostało licznymi badaniami wpływu powyższych parametrów na przeżycia i ryzyko wznowy^(7,8).

Obserwacja kliniczna chorych po leczeniu RSM potwierdza zjawisko wznów i niepowodzeń leczenia również w grupach kobiet, u których nie stwierdzono negatywnych czynników prognostycznych. Ostatnie lata wraz z towarzyszącym rozwojem biologii molekularnej przyniosły znaczący wzrost zainteresowania badaniami nad wartością prognostyczną markerów biologicznych, takich jak onkogeny i geny supresorowe^(9,10). Ponieważ przerzuty odległe zarówno do węzłów chłonnych, jak i do narządów miękkich stanowią znaczący odsetek niepowodzeń leczenia RSM, uwaga badaczy została nakierowana na poznanie mechanizmów powstawania przerzutów i wykorzystanie ekspresji białek biorących udział w tym procesie, zwłaszcza proteinaz i czynników wzrostu jako markerów przerzutowania⁽¹¹⁻¹³⁾.

W badaniach nad przydatnością biomarkerów w prognozowaniu u chorych na RSM najszerszej stosowane są techniki immunohistochemiczne. Z ich pomocą oceniano ekspresję onkogenów, czynników wzrostu, genów supresorowych, a także markerów proliferacji.

HER-2/neu (c-erbB2) jest onkogenem należącym do rodziny receptora kinazy tyrozynowej, jego ekspresja jest najczęściej związana z agresywnym przebiegiem klinicznym i gorszym rokowaniem u chorych na raka piersi⁽²⁾. Znacznie mniej wiemy o zależności od poziomu ekspresji HER-2/neu i jej znaczeniu prognostycznym w nowotworach o innych lokalizacjach. Potti i wsp. stwierdzili minimalny, a nawet całkowity brak ekspresji tego genu w rakach neuroendokrynnych płuca, podczas gdy w rakach niedrobnokomórkowych obserwowano wysoki poziom ekspresji HER-2/neu⁽³⁾. Niezwykle interesujące wyniki obserwowano w analizie ekspresji HER-2/neu

who did not show expression of this marker⁽⁹⁾. In the case of cervical cancer, both planoepithelial and adenomatous, different levels of HER-2/neu expression have been reported⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Lee et al. noticed HER-2/neu and EGFR expression in both types of cervical cancer⁽¹⁶⁾. Decreased HER-2/neu expression was a significant prognostic factor, indicating a reduction of overall- and symptom-free survival⁽¹⁸⁻²³⁾.

In our analysis, positive HER-2/neu expression was seen in 45.3% of patients. This proportion is similar to the results presented in other papers (25-56% range)^(21,22). According to several authors, it depends on histological type of tumour and clinical stage⁽²²⁾. Authors point out a higher proportion of positive HER-2/neu expression in planoepithelial cancer as compared with adenomatous type^(19,22). Our results did not reveal significant differences correlated with histological type of tumour. Nevertheless, noteworthy is the fact of small proportion of adenomatous cancer in our series. Many investigators found a correlation between HER-2/neu expression and pelvic lymph node metastases⁽²⁰⁻²²⁾. This correlation was particularly visible in adenomatous cancer^(22,23). Our results did not confirm such a correlation and there were no significant differences in HER-2/neu expression in subgroups with and without regional lymph node metastases or with varying numbers of lymph node involved. Ultimate verification of prognostic usefulness of a given biomarker is provided by its impact on survival. Few investigators have ever performed such an analysis. Our results, obtained after multivariate Cox analysis, point to HER-2/neu as an independent prognostic factor influencing symptom-free survival. Risk of recurrence or death in the group of patients with strong HER-2/neu expression (2+, 3+) was 2.7-fold higher than in the group with none or weak HER-2/neu expression (0, 1+). Our experiences enable us to state, based on the results of this study, that a particularly unfavourable phenotype of cervical cancer are cases with regional lymph node metastases and overexpression of HER-2. Similar results have been obtained by Mondai et al.⁽²¹⁾ These authors demonstrated a significant influence of HER-2/neu overexpression on 3- and 5-year survival in patients with planoepithelial cervical cancer. Probability of 3- and more years' survival was 3-fold lower in patients with overexpression of this biomarker. However, they did not notice any correlation between HER-2/neu overexpression and basic prognostic factors, i.e. microinvasion of parametrial tissue and regional lymph node metastases. Hale et al.⁽²²⁾ also stated a significantly lower survival rate in cases of planoepithelial cancer with HER-2/neu overexpression.

Extremely interesting results were obtained by analysing expression of HER-2/neu in small-cell neuroendocrine tumours. Gugger et al. noticed expression of HER-2/neu in all subtypes of neuroendocrine tumours⁽¹⁴⁾. These investigators saw a decreased expression thereof in clin-

w drobnokomórkowych guzach neuroendokrynych. Gugger i wsp. stwierdzili ekspresję HER-2/neu we wszystkich podtypach guzów neuroendokrynych⁽¹⁴⁾. Badacze ci zaobserwowali obniżoną ekspresję w agresywnych klinicznie postaciach tego nowotworu. Jedynie w 9% guzów neuroendokrynych wielokomórkowych i 7% drobnokomórkowych stwierdzono ekspresję HER-2/neu, podczas gdy w rakowiakach ekspresję obserwowano w 40-50% przypadków. Przeciwnie wyniki uzyskali Potti i wsp.⁽³⁾ W ich doświadczeniach przeżycia chorych zarówno całkowite, jak i bezobjawowe były znamienne krótsze w grupie z pozytywną reakcją immunohistochemiczną na HER-2/neu w porównaniu z grupą chorych, u których nie stwierdzono ekspresji tego markera⁽³⁾. W przypadku RSM zarówno płaskonabłonkowego, jak i gruczołowego obserwowano różny poziom ekspresji HER-2/neu⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Lee i wsp. w analizowanej grupie chorych stwierdzili nadekspresję HER-2/neu i EGFR zarówno w raku płaskonabłonkowym, jak i gruczołowym⁽¹⁶⁾. Spadek ekspresji HER-2/neu był znamienne statystycznym czynnikiem wskazującym na obniżenie odsetka przeżyć całkowitych i bezobjawowych⁽¹⁸⁻²³⁾.

W analizie własnej dodatnią ekspresję HER-2/neu stwierdzono u 45,3% chorych. Odsetek ten zbliżony jest do wyników prezentowanych w innych opracowaniach (przedział 25-56%)^(21,22). Zdaniem wielu badaczy zależy on od typu histologicznego nowotworu oraz stopnia zaawansowania⁽²²⁾. Wskazuje się na wyższy odsetek dodatniej ekspresji HER-2/neu w raku płaskonabłonkowym w porównaniu z rakami gruczołowymi^(19,22). Analiza własna nie wykazała istotnych statystycznie różnic w zależności od typu histologicznego nowotworu. Należy jednak podkreślić fakt niskiego odsetka przypadków raka gruczołowego w analizowanej serii. Wielu badaczy wykazało również korelację ekspresji HER-2/neu z przerzutami do węzłów chłonnych miednicy⁽²⁰⁻²²⁾. Zależność tę wykazywano szczególnie w raku gruczołowym^(22,23). Badania własne nie potwierdziły takiej zależności, a stwierdzona ekspresja HER-2/neu nie różniła się w podgrupach chorych bez przerzutów i z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych oraz w podgrupach z różną liczbą przerzutów. Ostateczną weryfikacją przydatności prognostycznej danego biomarkera jest jego wpływ na przeżycia. Niewielu badaczy przeprowadzało tego typu analizę. Wyniki własne uzyskane po przeprowadzeniu wieloczynnikowej analizy Coksa wskazały na ekspresję HER-2/neu jako na niezależny czynnik prognostyczny wpływający na przeżycia bezobjawowe. Ryzyko wznowy lub zgonu chorych z wysoką ekspresją HER-2/neu (2+, 3+) było 2,7 razy wyższe od ryzyka wznowy w grupie chorych z brakiem lub niską ekspresją HER-2/neu (0, 1+). Doświadczenia własne pozwalają stwierdzić na podstawie wyników przeprowadzonego badania, że szczególnie niekorzystny fenotyp RSM to przypadki z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych i nadekspresją HER-2/neu. Podobne wyniki uzyskali Mondai

ically aggressive forms of this neoplasm. HER-2/neu expression was present in only 9% of large-cell neuroendocrine tumours and in 7% of small-cell tumours, while carcinoids show HER-2/neu expression in 40-50% of the cases. Opposite results were obtained by Potti et al.⁽³⁾ In their experience, both overall and symptom-free survival was significantly shorter in patients with a positive immunohistochemical reaction for HER-2/neu than in persons with no expression of this marker⁽³⁾. In the case of cervical cancer, both planoepithelial and adenomatous, varying levels of HER-2/neu expression have been observed⁽⁷⁻⁹⁾. Lee et al. noticed an overexpression of HER-2/neu and EGFR, both in planoepithelial and in adenomatous cancers⁽⁸⁾. Decreased HER-2/neu expression was a significant prognostic factor, associated with a reduction of overall and symptom-free survival rates⁽¹⁸⁻²³⁾. Recent years are marked by a significant progress in the treatment of invasive cervical cancer, improvement in the management of early forms of cervical cancer with unfavourable prognostic factors and in cases of late-stage disease, particularly due to implementation of radiochemotherapy. Clinical experiences with synchronous platinum-based chemotherapy combined with radiotherapy support an elevation of overall survival rate by 10-20%⁽²⁴⁾. Unfortunately, this progress is counter-balanced by higher toxicity of combination protocols. Therefore, identification of cases with potentially good response or resistance to therapy with classic management modalities is crucial. Assessment of genetic profile of tumour developing in a particular patient provides potential perspectives of modification of therapeutic strategy. Such modifications, e.g. escalation of radiation dose in patients with higher risk of local recurrence or use of adjuvant chemotherapy in patients with high risk of distant metastases⁽²⁵⁾. To date, most advanced studies concerning genetic profile have been performed on patients with breast cancer. Underway are clinical trials MINDACT (Microarray In Node-negative Disease may Avoid ChemoTherapy), aiming at identification of subpopulation of breast cancer patients who might safely avoid chemotherapy⁽²⁶⁾. Studies aiming at identification of genetic profile of cervical cancer include experimental work using microarray technology. To-date, results of 4 microarray studies have been published, testing from 10 000 to 23 000 genes⁽²⁷⁻³⁰⁾. In all papers, the principal aim of studies was to identify differences in genetic profile of patients with favourable and unfavourable response to radiotherapy used. However, interpretation of results of assessment of genetic profile by microarray technique poses several problems. One of the main issues is a disproportion between number of variables tested (about 20 000) and limited number of cases (9 to 19 in published series). Considering such a large disproportion between number of variables tested and sample size, on statistical grounds one should expect a high proportion of false-positive results. In order to avoid interpretation errors,

i wsp.⁽²¹⁾ Badacze ci wykazali również znamienne statystycznie wpływ nadekspresji HER-2/neu na przeżycia 3- i 5-letnie chorych na płaskonabłonkowego RSM. Prawdopodobieństwo przeżycia powyżej 3 lat było 3-krotnie mniejsze u chorych z nadekspresją badanego biomarkera. Nie stwierdzili oni natomiast związku między nadekspresją i HER-2/neu a podstawowymi czynnikami prognostycznymi, takimi jak mikronacieki przymacic i przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych. Hale i wsp.⁽²²⁾ również wskazują na znamienne niższy odsetek przeżyć w przypadku raka płaskonabłonkowego z nadekspresją HER-2/neu.

Niezwykle interesujące wyniki obserwowano w analizie ekspresji HER-2/neu w drobnokomórkowych guzach neuroendokrynych. Gugger i wsp. stwierdzili ekspresję HER-2/neu we wszystkich podtypach guzów neuroendokrynych⁽¹⁴⁾. Badacze ci stwierdzili obniżoną ekspresję w agresywnych klinicznie postaciach tego nowotworu. Jedynie 9% guzów neuroendokrynych wielokomórkowych i 7% drobnokomórkowych wykazywało ekspresję HER-2/neu, podczas gdy w rakowiakach ekspresję obserwowano w 40-50% przypadków. Przeciwnie wyniki uzyskali Potti i wsp.⁽³⁾ W ich doświadczeniach przeżycia chorych zarówno całkowite, jak i bezobjawowe były znamienne krótsze w grupie z pozytywną reakcją immunohistochemiczną na HER-2/neu aniżeli w grupie chorych, u których nie stwierdzono ekspresji tego markera⁽³⁾. W przypadku RSM zarówno płaskonabłonkowego, jak i gruczołowego obserwowano różny poziom ekspresji HER-2/neu⁽⁷⁻⁹⁾. Lee i wsp. w analizowanej grupie chorych stwierdzili nadekspresję HER-2/neu i EGFR zarówno w raku płaskonabłonkowym, jak i gruczołowym⁽⁸⁾. Spadek ekspresji HER-2/neu był znamienne statystycznym czynnikiem wskazującym na obniżenie odsetka przeżyć całkowitych i bezobjawowych⁽¹⁸⁻²³⁾.

Dzięki wprowadzeniu radiochemioterapii ostatnie lata przyniosły istotny postęp w leczeniu inwazyjnego RSM, znaczny postęp w leczeniu wczesnych przypadków RSM z niekorzystnymi rokowniczymi czynnikami, a także w przypadkach zaawansowanego miejscowo nowotworu. Doświadczenia kliniczne z jednoczasową chemioterapią opartą na pochodnych platyny skojarzoną z radioterapią podniosły odsetek przeżyć całkowitych o 10-20%⁽²⁴⁾. Postęp ten okupiony jest jednak wyższą toksycznością leczenia. Dlatego tak istotne jest identyfikowanie przypadków o potencjalnie dobrej odpowiedzi lub oporności na leczenie przy zastosowaniu klasycznych metod postępowania. Ocena profilu genetycznego nowotworu występującego u określonej chorej stwarza potencjalne możliwości modyfikacji leczenia. Modyfikacje te to np. eskalacja dawki promieniowania u chorych z wyższym ryzykiem wznowy miejscowej lub zastosowania adiuwantowej chemioterapii u chorych z wysokim prawdopodobieństwem powstania przerzutów odległych⁽²⁵⁾. Dotychczas najbardziej zaawansowane prace dotyczące określenia profilu genetycznego prowadzone są u cho-

novel techniques of statistical analysis should be used, e.g. multiple testing using the “false discovery rate” algorithm. Verification of data was performed using neuronal networks. Ultimate verification of results obtained is practical usefulness of prognostic values of a particular set of genes in an independent group of patients. Studies performed so far confirmed a correlation between the set of genes defined as “malignant phenotype” and treatment outcome. A more detailed analysis of results obtained in particular studies revealed a lack of consistency in sets of genes considered prognostically significant. This observation may be explained by the fact, that more than one set of genes may have prognostic significance, or that identification of some genes was a false-positive finding. In order to avoid such interpretation errors, most authors recommend verification of results of assessment of genetic profile provided by microarray technique by other techniques, e.g. quantitative polymerase chain reaction (PCR) testing⁽²⁵⁾. Furthermore, we should keep in mind, that testing prognostic significance of gene expression in relation to therapeutic response is not always appropriate to assess such parameters as survival or risk of recurrence. While recently published studies on genetic profile did not succeed in identifying common gene sets for various groups, they did show an overexpression of genes in particular pathways controlling apoptosis, DNA repair, cellular adhesion and angiogenesis^(29,30). Prognostic significance of several proteins has been confirmed, e.g. FIF and CA9 mediating angiogenesis, KU70, KU80 and GADD45 mediating DNA repair, BCL2, BAX and p73 controlling apoptosis and ICAM-3, which controls cell-adhesion^(25,29,30). Results of studies on genetic profile of cervical cancer obtained to-date require confirmation by further studies on larger samples of patients, where endpoints will include not only therapeutic response but also survival time.

Presented results of our studies was not an attempt to define genetic profiles of cases of cervical cancer analysed. Immunohistochemical technique used to assess expression of biomarkers studied has too many limitations to attain this goal. Nevertheless, it enabled not only to assess of expression of selected biomarkers in a relatively large group of patients with long posttreatment follow-up, but also to evaluate their prognostic value measured by their impact on overall and symptom-free survival. Detailed analysis of both established and new prognostic factors highlighted and documented prognostic power of such factors as lymph node metastases, clinical stage, histological type and vascular space invasion. Significant prognostic value of HER-2/neu expression has been confirmed too. All above-mentioned prognostic factors had a strong influence on symptom-free survival. Results obtained should be considered promising and encouraging for further research on genetic profile of cervical cancer, using most modern molecular techniques,

rych na raka piersi. Obecnie prowadzone jest badanie kliniczne MINDACT (Microarray In Node-negative Disease may Avoid ChemoTherapy), którego celem jest identyfikacja subpopulacji chorych na raka piersi, u których można będzie uniknąć stosowania chemioterapii⁽²⁶⁾. W badaniach nad określeniem profilu genowego RSM również prowadzone są prace z zastosowaniem mikromacierzy. Dotychczas opublikowano wyniki czterech badań z zastosowaniem mikromacierzy testujących od 10 000 do 23 000 genów⁽²⁷⁻³⁰⁾. We wszystkich opracowaniach podstawowym celem badania była identyfikacja różnic w profilu genetycznym u chorych z dobrą i słabą odpowiedzią na zastosowaną radioterapię. W interpretacji wyników oceny profilu genetycznego za pomocą mikromacierzy pojawia się jednak wiele problemów interpretacyjnych. Jednym z podstawowych problemów interpretacyjnych jest dysproporcja między ilością testowanych zmiennych (ok. 20 000) i niewielką liczbą przypadków (w publikowanych seriach od 9 do 19). Przy tak dużej rozpiętości między ilością zmiennych a ilością próbek z punktu widzenia statystyki należy oczekiwać wysokiego odsetka wyników fałszywie dodatnich. Aby uniknąć błędów interpretacyjnych, należy zastosować nowatorskie techniki analizy statystycznej, tj. wielokrotne testowanie z zastosowaniem algorytmu *false discovery rate*. Dla weryfikacji danych stosowano techniki z wykorzystaniem sieci neuronowych. Ostateczną metodą uwiarygodnienia uzyskanych wyników jest praktyczna ocena wartości prognostycznej określonego zestawu genów w niezależnej grupie chorych. W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano korelację między zestawem genów określonych jako fenotyp nowotworowy a wynikami leczenia. Dokładniejsza analiza wyników uzyskanych w poszczególnych badaniach wskazuje praktycznie na brak powtarzalności genów w zestawach genów określonych jako istotne prognostycznie. Wy tłumaczeniem tej obserwacji może być to, że więcej niż jeden zestaw genów może mieć znaczenie prognostyczne lub że identyfikacja niektórych genów była wynikiem fałszywie dodatnim. Dla uniknięcia powyższych błędów interpretacyjnych zaleca się, aby wyniki oceny profilu genowego z zastosowaniem mikromacierzy były weryfikowane innymi technikami, takimi jak np. ilościowe PCR⁽²⁵⁾. Należy również wspomnieć o tym, że testowanie znaczenia prognostycznego ekspresji genów w odniesieniu do odpowiedzi na leczenie nie zawsze odpowiada takim parametrom, jak przeżycia czy ryzyko wznowy. Mimo że w publikowanych badaniach nad profilem genowym nie zidentyfikowano wspólnych genów dla różnych grup, to jednak stwierdzono nadekspresję genów w poszczególnych ścieżkach: apoptozy, naprawy uszkodzeń DNA, adhezji komórek i angiogenezy^(29,30). Potwierdzono też znaczenie prognostyczne pojedynczych białek, tj.: FIF i CA9 biorących udział w angiogenezie, KU70, KU80 i GADD45 biorących udział w procesie naprawy DNA, BCL2, BAX, p73 regulującego apoptozę i ICAM-3

e.g. microarrays. Interest in such studies will increase in the near future, in parallel with continuing development of targeted therapy and need for a reliable prediction of response to particular oncological therapeutic modalities, by definition associated with high toxicity, such as radiotherapy and chemotherapy.

BIBLIOGRAPHY:

PIŚMIENNICTWO:

1. Wojciechowska U., Didkowska J., Tarkowski W., Zatoński W.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2004 roku. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2006: 51-53.
2. Tovey S.M., Witton C.J., Bartlett J.M. i wsp.: Outcome and human epidermal growth factor receptor (HER) 1-4 status in invasive breast carcinomas with proliferation indices evaluated by bromodeoxyuridine labelling. *Breast Cancer Res.* 2004; 6: R246-R251.
3. Potti A., Willardson J., Forseen C. i wsp.: Predictive role of HER-2/neu overexpression and clinical features at initial presentation in patients with extensive stage small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 2002; 36: 257-261.
4. Kaplan E.L., Meier P.: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 1958; 53: 457-481.
5. Cox D.R.: Regression models and life-tables. *J.R. Stat. Soc. B* 1972; 34: 187-220.
6. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 95 (1); 2006.
7. Stendahl U., Eklund G., Willén R.: Prognosis of invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a comparative study of the predictive values of clinical staging IB-III and a histopathologic malignancy grading system. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1983; 2: 42-54.
8. Stock R.J., Zaino R., Bundy B.N. i wsp.: Evaluation and comparison of histopathologic grading systems of epithelial carcinoma of the uterine cervix: Gynecologic Oncology Group studies. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1994; 13: 99-108.
9. Classon M., Harlow E.: The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 910-917.
10. Sherr C.J., McCormick F.: The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; 2: 103-112.
11. Nürnberg W., Artuc M., Nawrath M. i wsp.: Human c-myc is expressed in cervical carcinomas and transactivates the HPV-16 promoter. *Cancer Res.* 1995; 55: 4432-4437.
12. Weiss L.: Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev.* 2000; 19: I-XI, 193-383.
13. Chambers A.F., Groom A.C., MacDonald I.C.: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 563-572.
14. Gugger M., Burckhardt E., Kappeler A. i wsp.: Quantitative expansion of structural genomic alterations in the spectrum of neuroendocrine lung carcinomas. *J. Pathol.* 2002; 196: 408-415.
15. Lee C.M., Lee R.J., Hammond E. i wsp.: Expression of HER2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. *Gynecol. Oncol.* 2004; 93: 209-214.
16. Lee C.M., Shrieve D.C., Zempolich K.A. i wsp.: Correlation between human epidermal growth factor receptor fam-

ującego molekułą adhezji komórek^(25,29,30). Uzyskane dotychczas wyniki badań nad profilem genetycznym RSM wymagają potwierdzenia kolejnymi badaniami na większych grupach chorych, których punktem odniesienia obserwacji będzie nie tylko odpowiedź na leczenie, ale także czas przeżycia.

Przedstawione wyniki własnej analizy nie były próbą określenia profilu genetycznego badanych przypadków RSM. Technika immunohistochemiczna użyta do oceny ekspresji analizowanych biomarkerów ma zbyt wiele ograniczeń, aby osiągnąć ten cel. Pozwoliła jednak dokonać oceny ekspresji wybranych biomarkerów na dużej liczbie grupie chorych z wieloletnim okresem obserwacji po leczeniu i ocenić ich znaczenie prognostyczne mierzone wpływem na przeżycia całkowite i bezobjawowe. Szczegółowa analiza zarówno uznanych, jak i nowych czynników prognostycznych podkreśliła i udokumentowała moc prognostyczną takich czynników, jak: przerzuty do węzłów chłonnych, stopień klinicznego zaawansowania, typ histologiczny oraz inwazja przestrzeni naczyniowej.

Wykazano też istotną wartość prognostyczną ekspresji HER-2/neu. Wszystkie wymienione czynniki prognostyczne miały istotny wpływ na przeżycia bezobjawowe.

Uzyskane wyniki należy traktować jako bardzo obiecujące i zachęcające do dalszych badań nad profilem genetycznym raków szyjki macicy z zastosowaniem najnowszych technologii molekularnych, takich jak mikromacierze. Zainteresowanie takimi badaniami niewątpliwie będzie rosło w najbliższej przyszłości, w miarę dalszego rozwoju terapii celowanej oraz potrzeby skuteczniejszego przewidywania odpowiedzi na metody terapii onkologicznej charakteryzujące się wysoką toksycznością, takie jak np. radioterapia i chemioterapia.

ily (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecol. Oncol.* 2005; 99: 415-421.

17. Mitra A.B., Murty V.V., Pratap M. i wsp.: ERBB2 (HER2/neu) oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1994; 54: 637-639.
18. Tangjitgamol S., Ramirez P.T., Sun C.C. i wsp.: Expression of HER-2/neu, epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2, estrogen receptor, and progesterone receptor in small cell and large cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: a clinicopathologic and prognostic study. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2005; 15: 646-656.
19. Kihana T., Tsuda H., Teshima S. i wsp.: Prognostic significance of the overexpression of c-erbB-2 protein in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1994; 73: 148-153.
20. Niibe Y., Nakano T., Ohno T. i wsp.: Prognostic significance of c-erbB-2/HER2 expression in advanced uterine cervical carcinoma with para-aortic lymph node metastasis treated with radiation therapy. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2003; 13: 849-855.

21. Mandai M., Konishi I., Koshiyama M. i wsp.: Altered expression of nm23-H1 and c-erbB-2 proteins have prognostic significance in adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1995; 75: 2523-2529.
22. Hale R.J., Buckley C.H., Fox H., Williams J.: Prognostic value of c-erbB-2 expression in uterine cervical carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 1992; 45: 594-596.
23. Oka K., Nakano T., Arai T.: c-erbB-2 oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer* 1994; 73: 664-671.
24. Morris M., Eifel P.J., Lu J. i wsp.: Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 1137-1143.
25. Klopp A.H., Eifel P.J.: Gene expression profiling in cervical cancer: state of the art and future directions. *Cancer J.* 2006; 12: 170-174.
26. Brenton J.D., Carey L.A., Ahmed A.A., Caldas C.: Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 7350-7360.
27. Wong Y.F., Sahota D.S., Cheung T.H. i wsp.: Gene expression pattern associated with radiotherapy sensitivity in cervical cancer. *Cancer J.* 2006; 12: 189-193.
28. Wong Y.F., Selvanayagam Z.E., Wei N. i wsp.: Expression genomics of cervical cancer: molecular classification and prediction of radiotherapy response by DNA microarray. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9: 5486-5492.
29. Kitahara O., Katagiri T., Tsunoda T. i wsp.: Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis. *Neoplasia* 2002; 4: 295-303.
30. Harima Y., Togashi A., Horikoshi K. i wsp.: Prediction of outcome of advanced cervical cancer to thermoradiotherapy according to expression profiles of 35 genes selected by cDNA microarray analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004; 60: 237-248.

Information for contributors!

In order to ensure a higher MNI_{SW} and Index Copernicus score for our journal "Ginekologia Onkologiczna", we ask you to comply with the following conditions when preparing your manuscripts for publication:

- Authors' **affiliation** should be clearly stated, providing the name of centre, address for correspondence, phone and fax number and e-mail address.
- Original paper should be preceded by an **abstract** counting **200-250 words**, while a review paper and case report should have abstracts **150-200 words** long. Abstract of original paper should be structured, i.e. should be subdivided into the following sections: introduction, material and method, results and conclusions.
- The number of **key words** should not be less than 5. Key words should not be a repetition of the title. At best, use key words from the MeSH catalogue.
- **Original paper** should include the following sections: introduction, material and method, results, discussion, conclusions, references.
- **References** should be listed in the **order of appearance**.

Informacja dla autorów!

Chcąc zapewnić naszemu czasopismu „Ginekologia Onkologiczna” wyższą indeksację MNI_{SW} i Index Copernicus, zwracamy się do Państwa o dopełnienie poniższych warunków podczas przygotowywania pracy do publikacji:

- Publikację należy opatrzyć **afiliacją** – z podaną nazwą ośrodka/ów, adresem do korespondencji, numerem telefonu, faksu, adresem e-mail.
- Praca oryginalna powinna być poprzedzona **streszczeniem** zawierającym **200-250 słów**, a poglądowa i kazuistyczna – **150-200 słów**. Streszczeniu pracy oryginalnej należy nadać budowę strukturalną: wstęp, materiał i metoda, wyniki, wnioski.
- Liczba **słów kluczowych** nie może być mniejsza niż 5. Słowa kluczowe nie powinny być powtórzeniem tytułu. Najlepiej stosować słowa kluczowe z katalogu MeSH.
- **Praca oryginalna** winna zawierać elementy: wstęp, materiał i metoda, wyniki, omówienie, wnioski, piśmiennictwo.
- **Piśmiennictwo** należy ułożyć w **kolejności cytowania**.