

I. Ziółkowska-Seta¹, P. Derlatka¹, P. Sobiczewski¹, G. Panek¹,
E. Kraszewska², J. Kupryjańczyk³, M. Bidziński¹,
R. Mądry⁴, J. Markowska⁴

Received: 08.11.2006

Accepted: 30.11.2006

Published: 31.12.2006

Analysis of selected molecular and clinical factors in patients with ovarian cancer treated with taxanes and cisplatin

Analiza wybranych czynników molekularnych i klinicznych u pacjentek leczonych z powodu raka jajnika taksanami i cisplatyną

Анализ избранных молекулярных и клинических факторов у пациенток, которые лечились таксанами и цисплатиной в связи с раком яичника

¹ Klinika Nowotworów Narządów Płciowych Kobięcych Centrum Onkologii w Warszawie.

Kierownik Kliniki: doc. dr hab. n. med. Mariusz Bidziński

² CMKP w Warszawie – mgr Ewa Kraszewska

³ Zakład Patologii Molekularnej Centrum Onkologii w Warszawie. Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Jolanta Kupryjańczyk

⁴ Klinika Onkologii Akademii Medycznej w Poznaniu, Oddział Ginekologii. Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. Janina Markowska

Correspondence to: Klinika Nowotworów Narządów Płciowych Kobięcych Centrum Onkologii

– Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa

Source of financing: Department own sources

Summary

Introduction: Paclitaxel and platinum analogs are standard drugs implemented as first-line therapy in advanced ovarian cancer, after previous surgery. One of causes of resistance to therapy is, among others, disruption of mechanisms leading to cell apoptosis. **Aim of the paper** is to determine the significance of expression of TP53, BAX and BCL-2 in response to first-line chemotherapy using paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer, as well as to assess the role of TP53 as a prognostic and predictive factor in ovarian cancer. **Material and method:** The study included 164 patients with advanced ovarian cancer. Immunohistochemical staining was performed on histological specimens obtained from paraffin blocks. Monoclonal antibodies anti-BAX, anti-BCL-2 and anti-p53 were used. **Results:** Accumulation of TP53 was noticed in 60% of tumors. BCL-2 was absent in half of tumors studied. Significant expression of BCL-2 was noticed in 24% of tumors, while that of BAX was seen in 34% of tumors. There was a correlation of histological grade, volume of residual tumor left after surgery and BAX expression with overall survival. Enhanced expression of BAX correlated directly with increased death risk. Accumulation of none of proteins studied had any influence on disease-free survival. Complete remission was obtained in 106 patients. Size of residual tumor has a significant impact on disease-free survival. **Conclusions:** 1) In ovarian cancer patients, clinical factors clearly have far greater prognostic value than molecular factors. 2) There was no correlation between TP53 expression and clinical response to first-line chemotherapy using paclitaxel, cisplatin or platinum analogs. 3) TP53 expression is not a prognostic or predictive factor in ovarian cancer.

Key words: ovarian cancer, taxanes, TP53, BCL-2, BAX

Streszczenie

Wstęp: Paklitaksel i analogi platyny są standardem postępowania w pierwszej linii leczenia w zaawansowanym raku jajnika, po uprzedniej chirurgii. Przyczyną oporności na leczenie jest między innymi uszkodzenie mechanizmów prowadzących do apoptozy. **Celem naszej pracy** jest określenie znaczenia ekspresji TP53, BAX i BCL-2 w odpowiedzi na chemioterapię pierwszej linii z zastosowaniem paklitakselu u pacjentek z zaawansowanym

rakiem jajnika, jak również ocena TP53 jako czynnika prognostycznego i predykcyjnego w raku jajnika. **Materiał i metody:** Badanie przeprowadzono u 164 chorych z zaawansowanym rakiem jajnika. Barwienia immunohistochemiczne zostały wykonane na materiale z bloczków parafinowych. Stosowano przeciwciała monoklonalne anty-BAX, anty-BCL-2 i anty-p53. **Wyniki:** Akumulację TP53 stwierdzono w 60% guzów. Obecności BCL-2 nie wykazano w połowie badanych guzów. Silną ekspresję BCL-2 stwierdzono w 24%, zaś silną ekspresję BAX – w 34% guzów. Wykazano wpływ histologicznego stopnia zaawansowania, wielkości pozostawionych resztek oraz ekspresji BAX na całkowite przeżycia. Przy silnej ekspresji BAX ryzyko zgonu było większe. Akumulacja żadnego białka nie miała wpływu na długość czasu wolnego od choroby. Całkowitą remisję uzyskano u 106 pacjentek. Wielkość pozostawionych resztek miała znaczący wpływ na długość czasu wolnego od choroby. **Wnioski:** 1) Czynniki kliniczne mają zdecydowanie większe znaczenie prognostyczne niż czynniki molekularne w raku jajnika. 2) Nie zaobserwowano związku pomiędzy stanem TP53 a odpowiedzią na leczenie pierwszej linii chemioterapii z zastosowaniem paklitakselu i cisplatin lub analogów platyny. 3) Nie wykazano znaczenia TP53 jako czynnika prognostycznego i predykcyjnego w raku jajnika.

Słowa kluczowe: rak jajnika, taksany, TP53, BCL-2, BAX

Содержание

Введение: Паклитаксел и производные платины являются стандартом поведения в первой очереди лечения при прогрессивно развивающемся раке яичника, после предварительной хирургии. Причиной болезнестойкости во время лечения является в частности повреждение механизмов, которые способствуют утрате клеток (апоптозу). **Цель настоящей работы** состояла в том, чтобы определить значение выразительности TP53, БАИкс и БКЛ-2 при ответе на химиотерапию в первой очереди при использовании паклитаксела у пациенток страдающих прогрессирующим раком яичника, а также оценка TP53 в качестве прогнозирующего и предопределяющего фактора при раке яичника. **Материал и метод:** Исследование проводилось у 164 больных страдающих развивающимся раком яичника. Иммуногистохимическая окраска была проведена при использовании материала парафиновых блоков. Применялись моноклональные противела анти-БАИкс, анти-БКЛ-2 и анти-p53. **Результаты:** Аккумуляция TP53 констатирована в 60% опухолей. Наличия БКЛ-2 не обнаружено в половине исследуемых опухолей. Сильная выразительность БКЛ-2 отмечена у 24%, а сильная выразительность БАИкс в 34% опухолей. Отмечено влияние гистологической степени развития, величины оставленных остатков и выразительности БАИкс на полный период дальнейшей жизни. При сильной выразительности БАИкс риск смертности был более высокий. Аккумуляция в ни одном белке не имела влияния на продолжительность времени свободного от болезни. Полное исчезновение симптомов заболевания констатировано у 106 пациенток. Величина оставленных остатков имела существенное влияние на продолжительность времени свободного от болезни. **Выводы:** 1) Клинические факторы имеют определенно большее прогностическое значение чем молекулярные факторы при раке яичника. 2) Не была отмечена связь между уровнем TP53 и реакцией на лечение первой очереди химиотерапии при применении паклитаксела и цисплатины или аналогов платины. 3) Не констатировано значение TP53 в качестве прогностического и предопределяющего фактора при раке яичника.

Ключевые слова: рак яичника, таксаны, TP53, БКЛ-2, БАИкс

INTRODUCTION

Paclitaxel and platinum analogs are standard agents used in first-line therapy of advanced ovarian cancer, after previous surgery.

Among most frequently listed prognostic factors in ovarian cancer, the key determinant is clinical stage of the disease. Important is also the size of residual tumor after initial surgical resection and histological grade of differentiation of the tumor. Clinical studies published so far did not determine unequivocally the role of molecular prognostic factors in patients with ovarian cancer.

Only 70% of patients with advanced ovarian cancer respond to first-line chemotherapy. Causes of therapy-resistance include, among others, a disruption of mechanisms leading to apoptosis. Both paclitaxel and cisplatin induce apoptosis but by two different mechanisms.

WSTĘP

Paklitaksel i analogi platyny są standardem postępowania w pierwszej linii leczenia w zaawansowanym raku jajnika, po uprzedniej chirurgii.

Spośród najczęściej wymienianych czynników prognostycznych w raku jajnika podstawowym jest stopień zaawansowania choroby. Istotne znaczenie mają również wielkość pozostawionych resztek po pierwotnym zabiegu operacyjnym oraz stopień zróżnicowania histologicznego nowotworu. W dotychczasowych badaniach klinicznych nie określono jednoznacznie znaczenia molekularnych czynników prognostycznych u chorych na raka jajnika.

Tylko 70% pacjentek z zaawansowanym rakiem jajnika odpowiada na leczenie pierwszej linii chemioterapii. Przyczyną oporności na leczenie jest między innymi

In most studies using cultured ovarian cancer cell lines, the effect of cisplatin depends on TP53^(1,2), while mutations of the *TP53* gene lead to resistance to cisplatin^(2,3). However, this was never confirmed unequivocally by clinical trials⁽⁴⁻⁷⁾. In contrast to cisplatin, the effect of paclitaxel depends on the protein TP53⁽⁸⁻¹⁰⁾. Studies on cell lines indicate that the presence of normal TP53 may even have an unfavorable impact on the effects of paclitaxel⁽¹¹⁾, while loss of TP53 protein function enhances the susceptibility to taxanes, resulting in blocking the cell cycle in the G2/M phase with subsequent apoptosis^(10,12). Clinical studies performed to date do not confirm any correlation between TP53 status and response to paclitaxel⁽¹³⁻¹⁹⁾.

Proteins of the BCL-2 family regulate the process of apoptosis. Some cell-line studies showed an association between high expression of BCL-2 and resistance to cisplatin^(1,3), while high expression of BAX enhanced sensitivity of cells to cisplatin^(1,20). Taxanes, by phosphorylation the BCL-2 protein, inhibit binding of BCL-2 and BAX, what in turn leads to apoptosis⁽²¹⁾. Both excessive expression of BCL-2 and low expression of BAX result in resistance to taxanes in cell-line studies^(22,23). Earlier clinical studies did not provide a clear-cut support for a correlation of BCL-2 and BAX status and response to chemotherapy⁽²⁴⁻²⁷⁾.

AIM OF THE PAPER

The aim of our paper was to determine the significance of expression of TP53, BAX and BCL-2 for response to first-line chemotherapy using paclitaxel in patients with advanced ovarian cancer, as well as to assess the role of TP53 as a prognostic and predictive factor in ovarian cancer.

MATERIAL AND METHODS

The study population included 164 patients treated at the Department of Female Genital Neoplasms of the Institute Center of Oncology in Warsaw, Poland, and at the Chair of Oncology of the Medical Academy in Poznań. Clinical stage of the disease has been determined based on surgical protocol and results of microscopic examination of specimens, according to FIGO criteria (1989). All specimens were again verified by a pathologist and classified according to WHO criteria⁽²⁸⁾. Histological differentiation grade was determined based on the 4-tiered scale according to criteria proposed by Barber⁽²⁹⁾. Patients' characteristics and features of surgical samples are presented in the table 1.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS

Immunohistochemical staining was performed on the material from paraffin-embedded tissue blocks, after heat induced epitope retrieval (HIER).

uszkodzenie mechanizmów prowadzących do apoptozy. Zarówno paklitaksel, jak i cisplatyna indukują apoptozę, ale w dwóch różnych mechanizmach.

W większości badań na liniach komórkowych raka jajnika efekt cisplatyny jest zależny od TP53^(1,2), a mutacje genu *TP53* prowadzą do oporności na cisplatynę^(2,3). Nie zostało to potwierdzone jednoznacznie w badaniach klinicznych⁽⁴⁻⁷⁾. W przeciwieństwie do cisplatyny efekt paklitakselu jest niezależny od białka TP53⁽⁸⁻¹⁰⁾. W badaniach na liniach komórkowych obecność prawidłowego TP53 wpływa wręcz niekorzystnie na działanie paklitakselu⁽¹¹⁾, a utrata funkcji białka TP53 zwiększa wrażliwość na taksany, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M, a następnie apoptozy^(10,12). Dotychczasowe badania kliniczne nie potwierdzają związku pomiędzy stanem TP53 a odpowiedzią na leczenie paklitakselem⁽¹³⁻¹⁹⁾.

Białka z rodziny BCL-2 regulują proces apoptozy. W niektórych badaniach na liniach komórkowych zaobserwowano związek pomiędzy wysoką ekspresją BCL-2 a opornością na cisplatynę^(1,3), z kolei wysoka ekspresja BAX powodowała większą wrażliwość komórek na cisplatynę^(1,20). Taksany, fosforylując białko BCL-2, uniemożliwiają wiązanie białka BCL-2 z białkiem BAX, a to z kolei prowadzi do apoptozy⁽²¹⁾. Zarówno nadmierna ekspresja BCL-2, jak i niska ekspresja BAX prowadzą do oporności na taksany w badaniach na liniach komórkowych^(22,23). We wcześniejszych badaniach klinicznych nie potwierdzono jednoznacznie związku między stanem BCL-2 oraz BAX a odpowiedzią na chemioterapię⁽²⁴⁻²⁷⁾.

CEL PRACY

Celem naszej pracy jest określenie znaczenia ekspresji TP53, BAX i BCL-2 w odpowiedzi na chemioterapię pierwszej linii z zastosowaniem paklitakselu u pacjentek z zaawansowanym rakiem jajnika, jak również ocena TP53 jako czynnika prognostycznego i predykcyjnego w raku jajnika.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono na materiale 164 chorych z Kliniki Nowotworów Narządów Płciowych Kobięcych Centrum Onkologii – Instytutu w Warszawie oraz z Katedry Onkologii Akademii Medycznej im. K. Marcinkiewicza w Poznaniu.

Stopień klinicznego zaawansowania ustalono na podstawie protokołu operacyjnego i wyniku badania histopatologicznego zgodnie z kryteriami Międzynarodowej Federacji Ginekologów i Położników (FIGO 1989). Wszystkie guzy były oceniane ponownie przez patologa i zaklasyfikowane zgodnie z kryteriami WHO⁽²⁸⁾. Stopień histologicznej dojrzałości ustalono w czterostopniowej skali zgodnie z kryteriami podanymi przez Barbera⁽²⁹⁾.

| | |
|---|---|
| | N=164 |
| Age Wiek (min, max) mean (SD) średnia (odch. std.) | (20, 78) 53.7 (11.2) |
| FIGO IIB IIC IIIA IIIB IIIC IV | 7 (4%) 2 (1%) 7 (4%) 16 (10%) 114 (69.5%) 18 (11%) |
| Residual tumor after surgery Resztki po zabiegu operacyjnym 0 <0.5 cm 0.5-2 cm 2-5 cm >5 cm | 32 (19%) 30 (18%) 40 (24%) 16 (10%) 46 (28%) |
| Histological type Typ histologiczny serous surowiczy endometrioid endometrioidalny clear cell jasnokomórkowy undifferentiated niezróżnicowany other inne | 124 (76%) 5 (3%) 4 (2%) 14 (9%) 17 (10%) |
| Grade 2 3 4 | 23 (14%) 101 (62%) 40 (24%) |
| Chemosensitivity Chemiowrażliwość sensitive wrażliwość highly sensitive wysoka wrażliwość resistant oporność | 58 (36%) 32 (20%) 73 (45%) |
| Outcome of chemotherapy Stan po chemioterapii CR PR SD PD | 106 (65%) 46 (28%) 7 (4%) 5 (3%) |
| Recurrence Wznowa | 80/106 (75%) |
| Death Zgon | 99 (60%) |

Table 1. Characteristics of study material
Tabela 1. Charakterystyka materiału

Tumorous inflammatory infiltrate stained for the presence of BCL-2 and BAX constituted a reference for immunoreactivity of tissues. Monoclonal antibodies anti-BAX (clone B-9), anti-BCL-2 and anti-p53 were used. Deparaffined sections were boiled in citrate buffer (pH 6.0) at 700 W in a microwave heater: 3x5 min for BCL-2 and 6x5 min for BAX.

Non-specific reaction and reactivity of endogenous peroxidase were blocked by 10% BSA and 3% H₂O₂, respectively. Tissue sections were incubated with original antibodies for 1 hour at room temperature (anti-BCL-2) or overnight (all others). Biotinylated goat anti-mice IgG, peroxidase-conjugated streptavidin and DAB were used as detection system. Tumor lymphocytes and serum cells, as well as tonsillar tissue were used as controls for BCL-2 and BAX.

Semiquantitative immunohistochemical analysis of the preparations was performed by two independent pathologists (JK, TSZ). If accumulation of TP53 protein was noticed in over 10% of cells, the result was considered as positive, in the remaining cases – as negative. Expression of the BAX gene was considered as 0 – negative, trace, 1 – weak, 2 – moderate or 3 – strong.

Expression of the BCL-2 gene was considered as 0 – negative or focal, 1 – moderate (weak, moderate or strong staining in less than 2/3 of tumor cells) or 2 – strong (moderate or strong staining in over 2/3 of tumor cells).

STATISTICAL ANALYSIS

The influence of selected features on study endpoints was assessed using a multifactorial log model and proportional hazards model.

In constructing these models, the following parameters were considered: age (under 53 and over 53), FIGO stage (IIB/C, IIIA/B, IIIC, IV), residual tumor mass (0, below 2 and over 2 cm), histological type (serous, endometrioid, clear cell, undifferentiated, other), grade of histological differentiation (moderately differentiated, poorly differentiated, mostly non-differentiated), TP53, BCL-2 (0, 1, 2) and BAX (0, 1, 2, 3).

Using the stepwise elimination method, with the 0.1 level as criterion for remaining in the model, statistically significant factors were selected at the level of 0.05.

Calculations were performed using the software Stata v. 8.2.

RESULTS

ACCUMULATION OF TP53, BCL-2 AND BAX

Accumulation of TP53 protein was noticed in 60% of tumors (n=98). Presence of BCL-2 could not be demonstrated in over half of the tumors (51%; n=83), while moderate and strong expression of this inhibitor of apoptosis was seen in 35% (n=57) and 15% (n=24) of tumors

Charakterystykę chorych i badanego materiału przedstawiono w tabeli 1.

ANALIZA IMMUNOHISTOCHEMICZNA

Barwienia immunohistochemiczne zostały wykonane na materiale z bloczków parafinowych po indukowanym ciepłem odsłonięciu epitopu (*heat induced epitope retrieval*, HIER).

Naciek zapalny guza zabarwiony na obecność BCL-2 i BAX stanowił dowód na immunoreaktywność tkanek. Stosowano przeciwciała monoklonalne anti-BAX (clone B-9), anti-BCL-2 i anti-p53.

Odparafinowane skrawki gotowano w buforze cytrynianowym (pH 6,0) w 700 W w mikrofali 3x5 min dla BCL-2 i 6x5 min dla BAX.

Reakcję niespecyficzną i reaktywność endogennej peroksydazy blokowano odpowiednio 10% BSA i 3% H₂O₂. Skrawki tkankowe były inkubowane z pierwotnymi przeciwciałami przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (anti-BCL-2) lub całą noc (pozostałe). Biotynylowane kozie antymysie IgG, streptawidyna skoniugowana peroksydazą i DAB były stosowane jako system detekcji. Limfocytów guza i komórek osocza oraz tkanek migdałków użyto jako kontroli dla BCL-2 i BAX.

Półilościowa analiza immunohistochemiczna preparatów została przeprowadzona niezależnie przez 2 patologów (JK, TSZ). Jeżeli gromadzenie białka TP53 stwierdzono w ponad 10% komórek, oceniano wynik jako pozytywny, w pozostałych przypadkach jako negatywny. Ekspresję genu BAX określano jako 0 – negatywną, śladową, 1 – słabą, 2 – umiarkowaną i 3 – silną.

Ekspresję genu BCL-2 określano jako 0 – negatywną lub ogniskową, 1 – umiarkowaną (słabe, umiarkowane lub silne wybarwienie w mniej niż 2/3 komórek guza) oraz 2 – silną (umiarkowane lub silne barwienie w ponad 2/3 komórek guza).

METODY STATYSTYCZNE

Wpływ wybranych cech na punkty końcowe zbadano za pomocą wieloczynnikowego modelu logitowego oraz modelu proporcjonalnego ryzyka.

W modelach uwzględniono: wiek (<53, >53 lat), FIGO (IIB/C, IIIA/B, IIIC, IV), pozostałą masę guza (0, <2, >2 cm), typ histologiczny nowotworu (surowicy, endometrioidalny, jasnokomórkowy, niezróżnicowany, inne), stopień zróżnicowania histologicznego (średnio zróżnicowany, nisko zróżnicowany, przeważnie niezróżnicowany), TP53, BCL-2 (0, 1, 2) i BAX (0, 1, 2, 3).

Metodą krokowej eliminacji, z poziomem 0,1 dla pozostania w modelu, wybrano czynniki istotne statystycznie na poziomie 0,05.

Obliczenia wykonano w programie Stata v. 8.2.

respectively. Expression of BAX was weak in 24% (n=39), moderate in 30% (n=49) and strong in 34% (n=56) of tumors. It was absent in 12% of patients (n=20).

ANALYSIS OF OVERALL SURVIVAL

Among all clinical-histological parameters analyzed, statistically significant differences in survival rate were correlated with histological differentiation grade of tumors (G2 vs. G3; p=0.002 and G2 vs. G4; p=0.001). Overall survival depended also on size of residual tumor: 0 vs. <2 cm (p=0.014) and 0 vs. >2 cm (p<0.001).

Overall survival did not correlate with expression of most proteins studied. The only exception was BAX, strong expression thereof correlated with an increased risk of death (p=0.042) (table 2).

ANALYSIS OF RECURRENCE-FREE SURVIVAL

Among clinical factors, any correlation with recurrence-free survival was seen with FIGO clinical stage: IIIC vs. IIB/C (p=0.011) and IV vs. IIB/C (p=0.003).

Significant differences were demonstrated also when analyzing histological grades of tumor differentiation: G3-4 vs. G2 (p=0.018) (table 3).

Accumulation of none of the proteins studied had any influence on length of disease-free survival.

CHANCES FOR COMPLETE REMISSION AND RESISTANCE TO PLATINUM-BASED THERAPY

Complete remission was obtained in 65% of patients (n=106). In the analyzed group, the factor influencing complete remission turned out to be the size of residual

WYNIKI

AKUMULACJA TP53, BCL-2 I BAX

Akumulację białka TP53 stwierdzono w 60% guzów (n=98). Obecności BCL-2 nie wykazano w połowie badanych guzów (n=83; 51%), natomiast umiarkowaną lub silną ekspresję tego inhibitora apoptozy wykazano odpowiednio w 57 (35%) i 24 (15%) guzach. Ekspresja BAX była słaba w 39 (24%), umiarkowana w 49 (30%) i silna w 56 (34%) guzach. Nie stwierdzono jej u 20 chorych (12%).

ANALIZA PRZEŻYĆ CAŁKOWITYCH

Wśród analizowanych parametrów kliniczno-patologicznych znamienne statystycznie różnice w przeżyciu wykazano dla stopnia histologicznego zróżnicowania guzów G2 vs G3 (p=0,002) i G2 vs G4 (p=0,001). Przeżycie całkowite zależało również od wielkości pozostawionych resztek: 0 vs <2 cm (p=0,014) oraz 0 vs >2 cm (p<0,001).

Przeżycia całkowite nie były związane z ekspresją większości badanych białek. Jedynie przy silnej ekspresji BAX (p=0,042) ryzyko zgonu było większe (tabela 2).

ANALIZA CZASU PRZEŻYCIA WOLNEGO OD WZNOWY

Spośród czynników klinicznych znaczenie dla czasu wolnego od wznowy miał stopień klinicznego zaawansowania FIGO: IIIC vs IIB/C (p=0,011) i IV vs IIB/C (p=0,003).

| N=164, 99 deaths N=164, 99 zgonów | HR [95% CI] | p |
|--|--|-----------------|
| Residual tumor after surgery Resztki po zabiegu operacyjnym <2 vs. 0 cm >2 vs. 0 cm | 2.28 [1.18, 4.41] 3.38 [1.75, 6.53] | 0.014 <0.001 |
| Grade 3 vs. 2 4 vs. 2 | 3.34 [1.56, 7.17] 3.95 [1.77, 8.81] | 0.002 0.001 |
| BAX moderate expression vs. negative – weak expression umiarkowana ekspresja vs negatywna – słaba strong expression vs. negative – moderate expression silna ekspresja vs negatywna – umiarkowana | 1.61 [1.02, 2.54] | >0.1 0.042 |
| Age, FIGO stage, histological type, TP53 and BCL-2 expression did not influence overall survival. Wiek, stopień zaawansowania wg FIGO, typ histologiczny, ekspresja TP53 i BCL-2 nie miały wpływu na przeżycia całkowite. | | |

Table 2. Overall survival

Tabela 2. Przeżycie całkowite

| N=106, 80 recurrences N=106, 80 wznów | HR [95% CI] | p |
|--|--|------------------------|
| FIGO IIIA/B vs. IIB/C IIIC vs. IIB/C IV vs. IIB/C | 2.01 [1.17, 3.43] 4.09 [1.62, 10.4] | >0.1 0.011 0.003 |
| Grade 3-4 vs. 2 | 2.45 [1.17, 5.14] | 0.018 |
| Age, size of residual tumor after surgery, histological type and expression of TP53, BCL-2 and BAX did not influence disease-free survival. Wiek, wielkość resztek po zabiegu operacyjnym, typ histologiczny oraz ekspresja TP53, BCL-2 i BAX nie miały wpływu na przeżycia wolne od choroby. | | |

Table 3. Disease-free survival

Tabela 3. Przeżycie wolne od choroby

tumor left behind at the time of initial surgery: 0 vs. <2 cm (p=0.014) and 0 vs. >2 cm (p<0.001).

In the study population, 45% of patients (n=73) showed resistance to platinum derivatives. To the contrary, 90 patients showed moderate or significant susceptibility to platinum. Clinical response to chemotherapy correlated with FIGO stage: IIIC vs. IIB/C, IIIA/B (p=0.042) and IV vs. IIB/C, IIIA/B (p=0.039) and residual tumor: <2 vs. 0 cm (p=0.036) and >2 vs. 0 cm (p=0.005).

We have not found any influence of expression of proteins studied on both the chance for complete remission and susceptibility to platinum derivatives (tables 4 and 5).

DISCUSSION

Clinical factors have a tremendous prognostic significance in patients with ovarian cancer, as was confirmed by several clinical trials⁽³⁰⁻³³⁾. Clinical stage (acc. to FIGO) and size of residual tumor are the key prognostic factors and exert a significant influence on disease-free

Znamienne różnice wykazano również, analizując stopnie zróżnicowania histologicznego guzów: G3-4 vs G2 (p=0,018) (tabela 3).

Akumulacja żadnego białka nie miała wpływu na długość czasu wolnego od choroby.

SZANSE NA CAŁKOWITĄ REMISJĘ I OPORNOŚĆ NA LECZENIE PREPARATAMI PLATYNY

Całkowitą remisję uzyskano u 106 (65%) pacjentek. W analizowanej grupie czynnikiem, który miał wpływ na uzyskanie całkowitej remisji, okazała się wielkość resztek pozostawionych w czasie pierwotnej operacji: 0 vs <2 cm (p=0,014) oraz 0 vs >2 cm (p<0,001).

W badanej grupie oporność na leczenie preparatami platyny wykazano u 73 (45%) chorych. U 90 pacjentek stwierdzono umiarkowaną lub znaczną wrażliwość na platynę. Odpowiedź na chemioterapię była związana ze stopniem FIGO IIIC vs IIB/C, IIIA/B (p=0,042)

| N=164, 106 CR | OR [95% CI] | p |
|---|--|-----------------------|
| FIGO IIIA/B vs. IIB/C IIIC vs. IIB/C IV vs. IIB/C | 0.37 [0.13, 1.1] | >0.1 >0.1 0.067 |
| Residual tumor after surgery Resztki po zabiegu operacyjnym <2 vs. 0 cm >2 vs. 0 cm | 0.14 [0.03, 0.67] 0.06 [0.01, 0.29] | 0.014 <0.001 |
| Adjustment: p=0.85 Dopasowanie: p=0,85 Area under curve ROC: 0.70 Pole pod krzywą ROC: 0,70 Age, histological type, histological grade and expression of TP53, BCL-2 and BAX did not influence complete remission rate. Wiek, typ histologiczny, stopień zaawansowania histologicznego oraz ekspresja TP53, BCL-2 i BAX nie miały wpływu na całkowitą remisję. | | |

Table 4. Chance of complete remission

Tabela 4. Szanse na całkowitą remisję

survival and overall survival⁽³⁴⁻³⁶⁾. Similar correlations are seen in our material too.

Residual tumor, remaining after initial surgical procedure, were an important parameter influencing complete remission and overall survival. Histological differentiation grade had a significant impact on overall survival and disease-free survival, thus supporting the results of hitherto published studies⁽³⁷⁻³⁹⁾.

Clinical factors proved to be far more important than molecular ones⁽¹³⁻¹⁶⁾. Studies on ovarian cancer cell lines revealed an association of low expression of BAX and resistance to paclitaxel⁽²³⁾, but this was not confirmed by the present study.

In our analysis, strong expression of BAX had a negative influence on overall survival, while expression of BCL-2 had no clinical implications.

In this study, effectiveness of standard chemotherapy based on a combination of paclitaxel and cisplatin or platinum analogs was measured in terms of clinical response to treatment. Complete remission rate was 65% (n=106). In hitherto published reports, complete remission rate was about 67% with paclitaxel or carboplatin⁽⁴⁰⁾ and 51% with paclitaxel and cisplatin⁽⁴¹⁾.

Earlier studies on ovarian cancer cell lines demonstrated that the presence of normal TP53 has an unfavorable influence on effectiveness of paclitaxel⁽¹¹⁾, while some authors saw an enhanced susceptibility to taxanes with loss of TP53 function^(10,12). Clinical trials published so far, while based on small groups of patients, did not demonstrate any prognostic significance of TP53 protein^(14,15). Lavarino et al.⁽¹³⁾ showed that tumors with mutation of TP53 gene respond better to paclitaxel, while Gadducci et al.⁽¹⁶⁾ emphasized the significance of TP53 protein as a predictive but not prognostic factor. In our study, we could not confirm any prognostic role of TP53

i IV vs IIB/C, IIIA/B (p=0,039) oraz z wielkością pozostawionych resztek: <2 vs 0 cm (p=0,036) i >2 vs 0 cm (p=0,005).

Nie stwierdzono wpływu ekspresji badanych białek zarówno na szansę na uzyskanie całkowitej remisji, jak i na wrażliwość na leczenie preparatami platyny (tabele 4 i 5).

OMÓWIENIE

Czynniki kliniczne mają ogromne znaczenie prognostyczne u pacjentek z rakiem jajnika, potwierdzone w wielu badaniach⁽³⁰⁻³³⁾. Stopień zaawansowania wg FIGO oraz wielkość pozostawionych resztek mają podstawowe znaczenie rokownicze i wpływają znacząco na czas wolny od choroby oraz całkowite przeżycia⁽³⁴⁻³⁶⁾. Podobne zależności widoczne są w naszym materiale.

Resztki guza po pierwotnym zabiegu operacyjnym były ważnym parametrem wpływającym na całkowitą remisję, jak również całkowite przeżycia. Stopień zróżnicowania histologicznego wpływał znacząco na przeżycia całkowite i czas wolny od choroby, co koresponduje z wynikami dotychczasowych badań⁽³⁷⁻³⁹⁾.

Czynniki kliniczne miały większe znaczenie niż czynniki molekularne⁽¹³⁻¹⁶⁾. W badaniach na liniach komórkowych raka jajnika zaobserwowano związek pomiędzy niską ekspresją BAX a opornością na paklitaksel⁽²³⁾, jednak nie obserwowano tego w niniejszym badaniu.

W naszej analizie silna ekspresja BAX wpływała negatywnie na całkowite przeżycia, natomiast nie stwierdzono klinicznego znaczenia ekspresji BCL-2.

W prezentowanym badaniu skuteczność standardowej chemioterapii opartej na kombinacji paklitakselu i cisplatyny lub analogów platyny była mierzona odpowiedzą na leczenie. Całkowita remisja wynosiła 65% (106 pacjentek). W opublikowanych doniesieniach całkowite

| N=163, 90 platinum-sensitive N=163, 90 wrażliwych | OR [95% CI] | p |
|--|-------------------|-------|
| FIGO | | |
| IIIA/B vs. IIB/C | | >0.1 |
| IIIC vs. IIB/C, IIIA/B | 0.32 [0.10, 0.96] | 0.042 |
| IV vs. IIB/C, IIIA/B | 0.22 [0.05, 0.92] | 0.039 |
| Residual tumor after surgery Resztki po zabiegu operacyjnym | | |
| <2 vs. 0 cm | 0.31 [0.1, 0.93] | 0.036 |
| >2 vs. 0 cm | 0.19 [0.06, 0.61] | 0.005 |
| Adjustment: p=0.60 Dopasowanie: p=0,60 Area under curve ROC: 0.70 Pole pod krzywą ROC: 0,70 Age, histological type, histological grade and expression of TP53, BCL-2 and BAX did not influence platinum-resistance. Wiek, typ histologiczny, stopień zaawansowania histologicznego oraz ekspresja TP53, BCL-2 i BAX nie miały wpływu na platynoooporność. | | |

Table 5. Chance of platinum-dependent resistance

Tabela 5. Szanse na oporność platynozależną

protein, just as in an earlier analysis of a group of patients treated with platinum.

At present, the most important parameters influencing the outcome of therapy are: clinical stage of the neoplasm, its histological maturity and size of residual tumor left after surgery.

It should be emphasized that molecular factors analyzed constitute only a tiny segment of complex interrelations within tumor cells, which may have an influence on treatment outcome. Further studies, particularly in the fields of DNA microarray techniques and proteomics, may enable identification of other factors.

CONCLUSIONS

1. Clinical factors have a far more important prognostic significance than molecular factors in ovarian cancer.
2. No correlation between TP53 status and response to first-line chemotherapy using paclitaxel, cisplatin and platinum analogs was noticed.
3. Neither prognostic nor predictive significance of TP53 in ovarian cancer could be demonstrated.

BIBLIOGRAPHY: PIŚMIENNICTWO:

1. Jones N.A., Turner J., McIlwrath A.J. i wsp.: Cisplatin and paclitaxel-induced apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between Bax and Bak up-regulation and the functional status of p53. *Mol. Pharmacol.* 1998; 53: 819-826.
2. Shimada M., Kigawa J., Kanamori Y. i wsp.: Mechanism of the combination effect of wild-type TP53 gene transfection and cisplatin treatment for ovarian cancer xenografts. *Eur. J. Cancer* 2000; 36: 1869-1875.
3. Herod J.J.O., Eliopoulos A.G., Warwick J. i wsp.: The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 1996; 56: 2178-2184.
4. Righetti S.C., Della Torre G., Pilotti S. i wsp.: A comparative study of p53 gene mutations, protein accumulation, and response to cisplatin-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 1996; 56: 689-693.
5. De Feudis P., Debernardis D., Beccaglia P. i wsp.: DDP-induced cytotoxicity is not influenced by p53 in nine human ovarian cancer cell lines with different p53 status. *Br. J. Cancer* 1997; 76: 474-479.
6. Fallows S., Price J., Atkinson R.J. i wsp.: p53 mutation does not affect prognosis in ovarian epithelial malignancies. *J. Pathol.* 2001; 194: 68-75.
7. Reles A., Wen W.H., Schmider A. i wsp.: Correlation of p53 mutations with resistance to platinum-based chemotherapy and shortened survival in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7: 2984-2997.
8. Debernardis D., Siré E.G., De Feudis P. i wsp.: p53 status does not affect sensitivity of human ovarian cancer cell lines to paclitaxel. *Cancer Res.* 1997; 57: 870-874.
9. Strobel T., Swanson L., Korsmeyer S., Cannistra S.A.: BAX enhances paclitaxel-induced apoptosis through a p53-independent pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1996; 93: 14094-14099.

ta remisja w przypadku stosowania paklitakselu i karboplatyny wynosiła około 67%⁽⁴⁰⁾, natomiast dla paklitakselu i cisplatin – 51%⁽⁴¹⁾.

Wcześniejsze badania na liniach komórkowych raka jajnika pokazały, że obecność prawidłowego TP53 wpływa niekorzystnie na działanie paklitakselu⁽¹¹⁾, a niektórzy autorzy donosili o zwiększeniu wrażliwości na taksany przy utracie funkcji TP53^(10,12). Dotychczasowe badania kliniczne, wszystkie na niewielkich grupach, nie wykazały prognostycznego znaczenia białka TP53^(14,15). Lavarino i wsp.⁽¹³⁾ stwierdzili, że guzy z mutacją genu *TP53* lepiej odpowiadają na paklitaxel, natomiast Gadducci i wsp.⁽¹⁶⁾ podkreślili znaczenie białka TP53 jako czynnika predykcyjnego, ale nie prognostycznego. W naszym badaniu nie obserwowano prognostycznego znaczenia białka TP53, podobnie jak we wcześniejszej analizie grupy pacjentek leczonych w oparciu o platynę. W obecnej dobie najważniejszymi parametrami wpływającymi na efekt terapii są zaawansowanie nowotworu, jego dojrzałość histologiczna i wielkość pozostawionych po operacji mas nowotworowych.

Należy podkreślić, że badane czynniki molekularne stanowią jedynie wycinek skomplikowanych zależności w komórkach nowotworu, które mogą wpływać na wyniki leczenia. Dalsze prace, szczególnie metodami mikromacierzy DNA i proteomiki, być może pozwolą na identyfikację innych czynników.

WNIOSKI

1. Czynniki kliniczne mają zdecydowanie większe znaczenie prognostyczne niż czynniki molekularne w raku jajnika.
2. Nie zaobserwowano związku pomiędzy stanem TP53 a odpowiedzią na leczenie pierwszej linii chemioterapii z zastosowaniem paklitakselu i cisplatin lub analogów platyny.
3. Nie wykazano znaczenia TP53 jako czynnika prognostycznego i predykcyjnego w raku jajnika.

10. Wahl A.F., Donaldson K.L., Fairchild C. i wsp.: Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat. Med.* 1996; 2: 72-79.
11. Cassinelli G., Supino R., Perego P. i wsp.: A role for loss of p53 function in sensitivity of ovarian carcinoma cells to taxanes. *Int. J. Cancer* 2001; 92: 738-747.
12. Vikhanskaya F., Vignati S., Beccaglia P. i wsp.: Inactivation of p53 in human ovarian cancer cell line increases the sensitivity to paclitaxel by inducing G2/M arrest and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 1998; 241: 96-101.
13. Lavarino C., Pilotti S., Oggionni M. i wsp.: p53 gene status and response to platinum/paclitaxel-based chemotherapy in advanced ovarian carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2000; 18: 3936-3945.
14. Laframboise S., Chapman W., McLaughlin J., Andrulis I.L.: p53 mutations in epithelial ovarian cancers: possible

- role in predicting chemoresistance. *Cancer J.* 2000; 6: 302-308.
15. Smith-Sorensen B., Kaern J., Holm R. i wsp.: Therapy effect of either paclitaxel or cyclophosphamide combination treatment in patients with epithelial ovarian cancer and relation to TP53 gene status. *Br. J. Cancer* 1998; 78: 375-381.
 16. Gadducci A., Cianci C., Cosio S. i wsp.: p53 status is neither a predictive nor a prognostic variable in patients with advanced ovarian cancer treated with a paclitaxel-based regimen. *Anticancer Res.* 2000; 20: 4793-4799.
 17. Gadducci A., Di Cristofano C., Zavaglia M. i wsp.: p53 gene status in patients with advanced serous epithelial ovarian cancer in relation to response to paclitaxel-plus platinum-based chemotherapy and long-term clinical outcome. *Anticancer Res.* 2006; 26: 687-693.
 18. Havrilesky L., Darcy K.M., Hamdan H. i wsp.: Prognostic significance of p53 mutation and p53 overexpression in advanced epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 3814-3825.
 19. Protopapas A., Diakomanolis E., Bamias A. i wsp.: The prognostic significance of the immunohistochemical expression of p53, bcl-2, c-erb B-2 and cathepsin-D in ovarian cancer patients receiving platinum with cyclophosphamide or paclitaxel chemotherapy. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2004; 25: 225-229.
 20. Beale P.J., Rogers P., Boxall F. i wsp.: BCL-2 family protein expression and platinum drug resistance in ovarian carcinoma. *Br. J. Cancer* 2000; 82: 436-440.
 21. Shitashige M., Toi M., Yano T. i wsp.: Dissociation of Bax from a Bcl-2/Bax heterodimer triggered by phosphorylation of serine 70 of Bcl-2. *J. Biochem. (Tokyo)* 2001; 130: 741-748.
 22. Ciardiello F., Caputo R., Borriello G. i wsp.: ZD1839 (IRESSA), an EGFR-selective tyrosine kinase inhibitor, enhances taxane activity in bcl-2 overexpressing, multi-drug-resistant MCF-7 ADR human breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 2002; 98: 463-469.
 23. Poruchynsky M.S., Giannakakou P., Ward Y. i wsp.: Accompanying protein alterations in malignant cells with a microtubule-polymerizing drug-resistance phenotype and a primary resistance mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 2001; 62: 1469-1480.
 24. Tai Y.T., Lee S., Niloff E. i wsp.: BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16: 2583-2590.
 25. Mano Y., Kikuchi Y., Yamamoto K. i wsp.: Bcl-2 as a predictor of chemosensitivity and prognosis in primary epithelial ovarian cancer. *Eur. J. Cancer* 1999; 35: 1214-1219.
 26. Berker B., Dunder I., Ensari A. i wsp.: Prognostic significance of apoptotic index and bcl-2 and p53 expression in epithelial ovarian carcinoma. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2002; 23: 505-510.
 27. Kupryjańczyk J., Szymańska T., Mądry R. i wsp.: Evaluation of clinical significance of TP53, BCL-2, BAX and MEK1 expression in 229 ovarian carcinomas treated with platinum-based regimen. *Br. J. Cancer* 2003; 88: 848-854.
 28. Russell P.: Surface epithelial-stromal tumors of the ovary. W: Kurman R.J. (red.): *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1994: 705-782.
 29. Barber H.R., Sommers S.C., Synder R., Kwon T.H.: Histologic and nuclear grading and stromal reactions as indices for prognosis in ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1975; 121: 795-807.
 30. Chi D.S., Liao J.B., Leon L.F. i wsp.: Identification of prognostic factors in advanced epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 2001; 82: 532-537.
 31. Makar A.P., Bakelandt M., Trope C.G., Kristensen G.B.: The prognostic significance of residual disease, FIGO substage, tumor histology, and grade in patients with FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 1995; 56: 175-180.
 32. Brun J.L., Feyler A., Chene G. i wsp.: Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2000; 78: 21-27.
 33. Griffiths C.T., Parker L.M., Lee S., Finkler N.J.: The effect of residual mass size on response to chemotherapy after surgical cytoreduction for advanced ovarian cancer: long-term results. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2002; 12: 323-331.
 34. Allen D.G., Heintz A.P., Touw F.W.: A meta-analysis of residual disease and survival in stage III and IV carcinoma of the ovary. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 1995; 16: 349-356.
 35. Eisenkop S.M., Friedman R.L., Wang H.J.: Complete cytoreductive surgery is feasible and maximizes survival in patients with advanced epithelial ovarian cancer: a prospective study. *Gynecol. Oncol.* 1998; 69: 103-108.
 36. Shimada M., Kigawa J., Minagawa Y. i wsp.: Significance of cytoreductive surgery including bowel resection for patients with advanced ovarian cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* 1999; 22: 481-484.
 37. Sorbe B., Frankendal B., Veress B.: Importance of histologic grading in the prognosis of epithelial ovarian carcinoma. *Obstet. Gynecol.* 1982; 59: 576-582.
 38. Malkasian G.D. Jr, Melton L.J. 3rd, O'Brien P.C., Greene M.H.: Prognostic significance of histologic classification and grading of epithelial malignancies of the ovary. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1984; 149: 274-284.
 39. Ozols R.F., Garvin A.J., Costa J. i wsp.: Advanced ovarian cancer: correlation of histologic grade with response to therapy and survival. *Cancer* 1980; 45: 572-581.
 40. Bookman M.A., McGuire W.P. 3rd, Kilpatrick D. i wsp.: Carboplatin and paclitaxel in ovarian carcinoma: a phase I study of the Gynecologic Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 1996; 14: 1895-1902.
 41. McGuire W.P., Hoskins W.J., Brady M.F. i wsp.: Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 1-6.