

lek.Sylwester Kubik

Rozprawa doktorska

Znaczenie oceny ekspresji markerów angiogenezy, limfangiogenezy i proliferacji w guzie nowotworowym oraz wybranych parametrów histologicznych, klinicznych i laboratoryjnych dla prognozowania wczesnych wyników leczenia chorych na miejscowo zaawansowanego raka szyjki macicy

Streszczenie

Pomimo ciągłego doskonalenia technik radioterapii oraz postępu w leczeniu systemowym rak szyjki macicy stanowi istotny problem społeczny u kobiet w Polsce. W większości przypadków inwazyjny rak szyjki macicy jest rozpoznawany w stadium miejscowo zaawansowanym, gdy metodą leczenia z wyboru jest radiochemioterapia. Dane z piśmiennictwa pokazują, że wyniki leczenia chorych na płaskonabłonkowego raka szyjki macicy w stopniach II B i III B zależą od szeregu czynników związanych z biologią guza nowotworowego oraz ze stanem ogólnym pacjentek. Poszukiwane są kolejne parametry, które pomogą wskazać lepiej i gorzej rokujące chore w celu indywidualizacji leczenia.

Cele pracy stanowiły:

1. Analiza ekspresji CD 34, podoplaniny oraz Ki67 w guzie nowotworowym u chorych zaawansowanego raka płaskonabłonkowego szyjki macicy.
2. Sprawdzenie wzajemnych zależności pomiędzy ekspresją CD 34, podoplaniny oraz Ki67 w guzie nowotworowym szyjki macicy, a stężeniem antygenu SCC w surowicy, wybranymi parametrami histologicznymi i klinicznymi u tych chorych.
3. Analiza okresu obserwacji po zakończonym leczeniu pod względem występowania nawrotów raka szyjki macicy oraz przeżycia chorych.
4. Ocena wartości oznaczania stężenia antygenu SCC w surowicy dla prognozowania wystąpienia nawrotu i przeżycia u chorych na płaskonabłonkowego raka szyjki macicy w stopniach IIB i IIIB .
5. Ustalenie, które z ocenianych parametrów histologicznych i klinicznych wnoszą istotne informacje dla prognozowania wczesnych wyników leczenia chorych na miejscowo zaawansowanego raka płaskonabłonkowego szyjki macicy.

Grupę badaną stanowiły 52 chore na raka płaskonabłonkowego szyjki macicy w stopniach IIB (n=39) i IIIB (n=13) wg klasyfikacji FIGO, leczone przez zespół lekarzy z Zakładu Teleradioterapii WWCOiT im. Kopernika w Łodzi w latach 2015-2017. Podczas wizyty kwalifikującej do leczenia była wypełniona pierwsza część ankiety badawczej oceniającej wywiad chorobowy, stan ogólny oraz wyniki badań dodatkowych chorej.

Schemat leczenia obejmował teleradioterapię na obszar macicy, obustronnie jajników i jajowodów, pierwotnego nacieku nowotworowego poza macicą oraz regionalnych węzłów chłonnych do dawki całkowitej 44 Gy frakcjonowanej po 2 Gy jeden raz dziennie pięć dni w

tygodniu z jednoczasowym podawaniem cisplatyny w dawce 40 mg/m^2 jeden raz w tygodniu do zakończenia napromieniania z pól zewnętrznych. U pacjentek z przeciwwskazaniami do cisplatyny była stosowana wyłączna radioterapia. Następnie stosowano brachyterapię HDR czterokrotnie w odstępach tygodniowych, każdorazowo dawka frakcyjna wynosiła 7.0 Gy do łącznej dawki 28 Gy . W sytuacji braku technicznych możliwości zastosowania brachyterapii HDR kontynuowano teleradioterapię (II etap) na obszar macicy i pierwotnego nacieku nowotworowego do dawki 60 Gy . W trakcie prowadzonego leczenia jeden raz w tygodniu odbywało się badanie kontrolne chorych i wypełniana była dalsza część ankiety badawczej. Po zakończonym leczeniu w poradni onkologicznej przy WWCOIT w Łodzi była prowadzona kontrola chorych. Obserwację chorych po leczeniu zakończono 31.12.2018 r. Ta data stanowiła punkt końcowy badania.

U chorych w grupie badanej wykonano odczyny immunohistochemiczne i zbadano ekspresję antygeny CD34, antygeny Ki67 oraz podoplaniny w guzie nowotworowym w preparatach wykonanych z uprzednio pobranych tkanek, które posłużyły do rozpoznania nowotworu, bez konieczności pobierania dodatkowego materiału tkankowego. Wszystkie barwienia immunohistochemiczne zostały wykonane w Zakładzie Patologii Katedry Onkologii UM w Łodzi zgodnie z instrukcją producentów przeciwciał. Odczyny immunohistochemiczne zostały ocenione przez specjalistę patomorfologii z Zakładu Patologii Katedry Onkologii UM w Łodzi w mikroskopii świetlnej, przy zastosowaniu 200-krotnego powiększenia.

Określono zróżnicowanie histologiczne nowotworu (grading) i zaawansowanie nowotworu w klasyfikacji wg FIGO. Dodatkowo oceniono wiek chorych, występowanie i wiek menopauzy, występowanie chorób układu krążenia, wywiad onkologiczny i przeszłość położniczą chorych. Odnotowano stężenia antygeny raka płaskonabłonkowego (SCC) w surowicy przed leczeniem, 6 tygodni po zakończeniu leczenia oraz zmianę stężenia SCC w tym okresie. Przeanalizowano sposób i czas leczenia chorych. Zbadano wzajemne zależności pomiędzy powyższymi parametrami, a także pomiędzy tymi parametrami i przebiegiem okresu obserwacji (follow-up), w tym występowaniem nawrotów choroby i przeżyciem chorych. Dokonano analizy statystycznej zgromadzonych danych. Na przeprowadzenie badania uzyskałem zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi nr RN/1/15/KE.

Średni wiek pacjentek w grupie badanej wynosił $59,75 \pm 10,97$ lat. Średni wiek chorych w stopniu zaawansowania II B nie różnił się istotnie statystycznie od średniego wieku chorych w stopniu III B ($p=0.124$), nie pozostawał też w zależności ze zróżnicowaniem histologicznym raka szyjki macicy ($p=0,1262$). W grupie badanej 26 pacjentek (50%) miało co najmniej jedną z chorób zwiększających ryzyko sercowo-naczyniowe. Były to pacjentki istotnie statystycznie starsze niż pacjentki bez tych chorób ($p<0.001$). Wiek zachorowania na raka szyjki macicy nie korelował z wiekiem osiągnięcia menopauzy ($p=0.94$). Drugi niezależny nowotwór u chorych na raka szyjki macicy rozpoznawano u 5 pacjentek (9.62%).

Mediana stężenia SCC-Ag w surowicy przed leczeniem była istotnie wyższa od mediany stężenia antygeny SCC po leczeniu. ($p<0,0001$). Pod wpływem leczenia stężenie SCC-Ag malało o średnio 10.68 ng/ml (mediana 6.7 ng/ml). Grading histologiczny raka dodatkowo korelował ze stopniem zaawansowania nowotworu wg FIGO IIB vs IIIB ($p<0,001$).

Poziom ekspresji CD34 ($p=0.64$) oraz poziom ekspresji Ki67 ($p=0.67$) nie różniły się istotnie statystycznie pomiędzy grupami pacjentek FIGO IIB i IIIB. Ekspresja CD34 ($p=0.38$) oraz ekspresja Ki67 ($p=0.37$) nie korelowały ze zróżnicowaniem histologicznym raka szyjki

macicy. Ekspresja CD34 korelowała natomiast istotnie statystycznie dodatnio z ekspresją Ki67 w guzie nowotworowym ($p=0.025$).

Ekspresja podoplaniny oceniana w 3 polach widzenia korelowała istotnie statystycznie dodatnio z ekspresją podoplaniny ocenianej w 5 polach widzenia ($p<0.001$). Nie wykazano zależności pomiędzy ekspresją podoplaniny, a ekspresją Ki67 oraz CD34 w guzie nowotworowym szyjki macicy ($p>0.05$ we wszystkich ocenach). Ekspresja podoplaniny nie wykazywała zależności ze stężeniem SCCAg w surowicy przed leczeniem, po leczeniu, ani z wielkością zmiany stężenia SCCAg pod wpływem leczenia ($p>0.05$ we wszystkich ocenach). Poziom ekspresji podoplaniny oceniany w 3 polach widzenia oraz w 5 polach widzenia nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy grupami pacjentek FIGO IIB i IIIB (odpowiednio: $p=0,343$; $p=0,292$), ani nie korelował ze zróżnicowaniem histologicznym raka szyjki macicy (odpowiednio: $p=0,341$; $p=0,369$).

Zdefiniowano pojęcie radioterapii standardowej jako schemat zawierający teleradioterapię do dawki 44 Gy w 22 frakcjach z brachyterapią HDR do dawki 28 Gy w 4 frakcjach po 7 Gy. Takie leczenie otrzymało 45 chorych (86,5%). Siedem chorych nie otrzymało takiego leczenia (13,5%). Pełną dawkę cisplatyny, tj. 4 wlewy leku w dawce 40 mg/m^2 i.v. otrzymało 28 pacjentek (53,84%), 18 pacjentek otrzymało 3 wlewy leku (34,62%), jedna pacjentka otrzymała 1 wlew leku (1,92%), a 5 chorych nie było leczone cisplatyną (9,62%). Średni czas leczenia (tzw. package time) zdefiniowany jako czas od początku radioterapii do zakończenia leczenia (końca brachyterapii lub innego końca terapii) wynosił 69.92 ± 16.12 dni. Nie wykazano zależności pomiędzy czasem leczenia a ekspresją CD34, ekspresją Ki67, ekspresją podoplaniny w guzie nowotworowym oraz innymi ocenianymi parametrami.

Pomimo leczenia, u 13 pacjentek (25%) w okresie od zakończenia leczenia do 31.12.2018 r. rozpoznano wznowę miejscową i/lub przerzuty odległe. Pięć pacjentek (9,62%), u których nie rozpoznawano wznowy, zmarło z przyczyn nieonkologicznych.

W analizie jednoczynnikowej wykazano, że ekspresja CD34 ($p=0.72$), podoplaniny ($p=0.23$ – 5 pól; 0.33 – 3 pola) i Ki67 ($p=0.17$) nie pozostawała w zależności z ryzykiem wznowy nowotworu. Niezależnymi czynnikami ryzyka wznowy miejscowej lub stwierdzenia przerzutu odległego w analizie jednoczynnikowej były wyższy grading histologiczny ($p=0.01$), większa liczba poronień ($p=0.019$), a także wyższe stężenie SCCAg po leczeniu ($p=0.039$). Pozostałe oceniane parametry nie wiązały się z wyższym ryzykiem wznowy w analizie jednoczynnikowej. Ze względu na zbyt małą liczebność grupy badanej nie było możliwości wykonania analizy wieloczynnikowej.

Pomimo leczenia, w trakcie obserwacji 11 pacjentek zmarło z przyczyn związanych z nowotworem (21,15%). Pięć pacjentek zmarło z innych przyczyn niż te związane z nowotworem (9,62%). Trzydzieści sześć pacjentek żyło w momencie zakończenia obserwacji (69,23%).

W analizie jednoczynnikowej wykazano, że ekspresja CD34 ($p=0.21$), podoplaniny ($p=0.18$ – 5 pól; $p=0.28$ – 3 pola) i Ki67 ($p=0.18$) nie pozostawała w zależności z ryzykiem zgonu z powodu nowotworu. Wykazano, że niezależnymi czynnikami ryzyka zgonu z powodu raka szyjki macicy w badanej grupie były wysoki grading histologiczny ($p=0.002$) oraz wyższe stężenie antygenu SCC w surowicy po leczeniu ($p=0.014$). Nie udowodniono zależności pomiędzy wyjściowym stężeniem antygenu SCC oraz wielkością zmiany stężenia SCCAg po zastosowanym leczeniu a ryzykiem zgonu z powodu raka szyjki macicy. Zależność pomiędzy

wysoką liczbą poronień i zwiększonym ryzykiem zgonu z powodu raka szyjki macicy znajdowała się na granicy istotności statystycznej ($p=0.05$). Istotnym statystycznie czynnikiem wydłużającym przeżycie było otrzymanie standardowego schematu radioterapii ($p=0.012$). Inne schematy leczenia wiązały się ze skróceniem czasu przeżycia. Nie potwierdzono dłuższego przeżycia po otrzymaniu 4 cykli chemioterapii w stosunku do sytuacji nieotrzymania pełnej dawki chemioterapii ($p=0.25$). Ze względu na zbyt małą liczebność grupy badanej nie została wykonana analiza wieloczynnikowa.

Z przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Nie wykazano zależności pomiędzy ekspresją CD34, Ki67 i podoplaniny w guzie nowotworowym, a zróżnicowaniem histologicznym, zaawansowaniem oraz innymi ocenianymi parametrami w miejscowo zaawansowanym raku płaskonabłonkowym szyjki macicy. Ekspresja CD34 dodatkowo korelowała z ekspresją Ki67.
2. W okresie obserwacji po leczeniu w badanej grupie u co czwartej pacjentki doszło do nawrotu nowotworu, który w 11 z 13 przypadków doprowadził do zgonu chorej.
3. Wielkość ekspresji CD34, podoplaniny i Ki67 w guzie nowotworowym nie pozostawała w zależności z ryzykiem wznowy oraz z ryzykiem zgonu z powodu raka szyjki macicy.
4. Niezależnym czynnikiem wystąpienia wznowy nowotworu oraz zgonu z powodu raka szyjki macicy było wysokie stężenie antygenu SCC w surowicy pacjentek 6 tygodni po zakończeniu leczenia. Podobne zależności nie dotyczyły stężenia antygenu SCC przed leczeniem.
5. Ryzyko wznowy raka szyjki macicy wzrastało przy wyższym stopniu zróżnicowania histologicznego guza nowotworowego i przy większej liczbie poronień, natomiast wyższe ryzyko zgonu dotyczyło pacjentek z wyższym stopniem zróżnicowania histologicznego guza nowotworowego oraz chorych, które nie otrzymały całkowitej zaplanowanej dawki teleradioterapii z brachyterapią HDR.

9. Summary

Despite the constant improvement of radiotherapy techniques and the advancement in the systematic treatment, cervical cancer remains a significant social problem among women in Poland. In most cases, invasive cervical cancer is diagnosed in a locally advanced stage when the chosen method of treatment is chemoradiotherapy. The data from the literature shows that the results of treatment in patients with squamous cell cervical cancer staged II B and III B depends on many factors connected with the biology of the cancerous tumour and the general condition of the patient. Other parameters are being searched to indicate patients forecasting better and worse in order to personalize the treatment.

The goals of the research were:

1. The analysis of CD34, podoplanin and Ki-67 expressions in cervical tumour in patients with locally advanced squamous cell cervical cancer.

2. Checking the relationship among CD34, podoplanin, Ki-67 expressions in the tumor of the cervix and the concentration of SCC antigen in serum, chosen histological and clinical parameters in the given patients.
3. The analysis of the follow-up after treatment in terms of recurrence of cervical cancer and survival rate of the patients.
4. The assessment of the level of SCC antigen concentration in serum for prognosing the recurrence and survival in patients with squamous cell cervical cancer staged II B and III B.
5. The assessment which of the assessed histological and clinical parameters introduce valid information for prognosis of the early treatment results in patients with locally advanced squamous cell cervical cancer.

The study group consisted of 52 patients with squamous cell cervical cancer, staged II B (n=39) and III B (n=13) according to FIGO classification treated in the Department of Teleradiotherapy WWCOiT Copernicus Memorial Hospital of Lodz , between 2015-2017. During the visit qualifying for treatment first part of the research survey was filled in, assessing previous illnesses, general health condition and results of additional medical examinations of the patient.

The protocol of treatment included teleradiotherapy in the area of uterus, both ovaries and fallopian tubes, area of infiltration outside of uterus and local lymph nodes up to the total dose of 44 Gy fractioned by 2 Gy once a day, five days a week with a one-time application of cisplatin in the dose of 40 mg/m² once a week till the outer fields radiation exposure is ceased. With patients where cisplatin was not allowed only radiotherapy was used. Next, HDR brachytherapy was used, four times with a one-week interval – each time the fractioned dose was 7.0 Gy with the final dose of 28 Gy. In case of technical lack of the possibility to use HDR brachytherapy, teletherapy (II stage) was continued on the area of uterus and initial cancerous infiltration to the final dose of 60 Gy. During the treatment, control medical check-up was conducted and the remaining parts of the research survey were filled in. After the treatment was finished in the outpatient oncologic clinic, the patients were still under medical control. This was finished 31.12.2018 which was the final point of the project.

In the study group an immunohistochemical reactions were done and antigen CD 34 expression, antigen Ki-67 expression and podoplanin expressions were checked in the cervical tumor specimens from previously taken tissues that were used to diagnose cancer, without any further need to take additional tissue specimens. All immunohistochemical procedures were done in the Pathology Unit Department of Oncology, Medical University of Lodz according to the antibody's producers' instructions. The immunohistochemical reactions were assessed by the specialists in pathology with the light microscopy magnifying 200 times. Histological grading of the cervical tumors and staging were assessed according to FIGO classifications. Additionally, the age of patients, menopause age and menopause occurrence, illnesses of the circulatory system, oncological survey and obstetric history past were assessed. The concentration of squamous cell carcinoma antigen (SCC) in the serum before the treatment and 6 weeks after treatment was recorded as well as the change in the SCC concentration in this period. The way and time of the treatment was analyzed. Mutual relationship between the above parameters was measured, and also between these parameters and the course of the follow-up period as well as the recurrence of the disease and survival rate. A statistical analysis was done based on the collected data. I have obtained the permission for the research from the Bioethical Commission of Medical University of Lodz, number RN/1/15/KE.

The average age of the patients was $59,75 \pm 10,97$ years. The average age in terms of stage II B was not statistically different from the average age of III B stage patients ($p=0.124$), and it was not connected with the grading ($p=0.1262$). Among the group of the tested, 26 patients (50%) had at least one of the illnesses increasing cardiovascular risk. These patients were statistically significantly older than the patients without these illnesses ($p<0.001$). The age of developing cervical cancer did not correlate with the age of menopause ($p=0.94$). Second, independent cancer among the patients with cervical cancer was diagnosed with 5 of them (9.62%).

The median of SCC-Ag concentration in the serum was significantly higher than the median of SCC-Ag concentration after the treatment ($p<0.0001$). Due to the treatment, the concentration of SCC-Ag decreased on average by 10.68 ng/ml (median 6.7ng/ml). Histological grading of the cancer correlated positively with to the staging (FIGO II B vs III B)($p<0.001$).

Level of CD34 expression ($p=0.64$) and level of Ki-67 expression ($p=0.67$) statistically did not differ significantly between patients FIGO II B and III B. CD34 expression($p=0.38$) and Ki-67 expression ($p=0.37$) did not correlate with the grading of the cervical cancer. CD34 expression, however, had statistically significant positive correlation with Ki-67 expression in the cancerous tumor ($p=0.025$).

Podoplanin expression in 3 fields of visibility statistically significantly positively correlated with the podoplanin expression assessed in 5 fields of visibility ($p<0.001$). No relationship was shown among podoplanin expression and Ki-67, and CD34 expressions in the tumor of the cervix ($p>0.05$ in all assessments). Podoplanin expression did not show any correlation with the SCC-Ag concentration in serum before treatment, after treatment and with the level of SCC-Ag concentration change due to the treatment ($p>0.05$ in all assessments). The level of podoplanin expression assessed in 3 fields of vision and in 5 fields of vision did not differ statistically significantly among the patients from FIGO II B and III B groups (accordingly: $p=0.343$; $p=0.292$, respectively) and did not correlate with the histological grading of the cervical cancer (accordingly: $p=0.341$; $p=0.369$, respectively).

Definition of standard radiotherapy was stated as a treatment including teletherapy up to the dose of 44 Gy in 22 fractions with HDR brachytherapy up to the dose of 28 Gy in 4 fractions 7 Gy each. Such treatment was administered to 45 patients (86.5%). Seven patients did not receive such treatment (13.5%). Full dose of cisplatin, which is 4 infusions of the medicine in the dose of 40 mg/m² IV was given to 28 patients (53.84%), 18 patients received 3 infusions of the medicine (34.62%), 1 patient received 1 infusion of cisplatin (1,92%) and 5 patients were not treated with cisplatin (9,62%). The average time of treatments (package time) was defined as time from the beginning of radiotherapy till the end of the treatment (end of HDR brachytherapy or any other end of the therapy) and was 69.92 ± 16.12 days. No correlation was shown between the length of the treatment and CD34, Ki-67 and podoplanin expressions in the tumor and other assessed parameters.

Despite the treatment, 13 patients (25%) were diagnosed with locoregional recurrence and/or distant metastases. Five patients (9.62%) who were not diagnosed with recurrence died due to non-oncologic reasons.

In a one-factor analysis it has been shown that expressions of CD34 ($p=0.72$), podoplanin ($p=0.23$ – fields; 0.33 – 3 fields) and Ki-67 ($p=0.17$) did not correlate with the risk of cancer

recurrence. Independent risk factors for local relapse or distant metastases in one-factor analysis were higher histological grading ($p=0.01$), higher number of miscarriages ($p=0.019$) as well as higher SCC-Ag concentration after the treatment ($p=0.039$). Remaining assessed parameters were not connected to a higher risk of recurrence in the one-factor analysis. Due to a small size of the study group there was no possibility to conduct a multi-factor analysis.

Despite the treatment, during observation period, 11 patients died due to the cancer (21.15%). Five patients died due to causes not connected to the cancer (9.62%). Thirty-six patients were alive when the observation was finished (69.23%).

In a one-factor analysis it was shown that the expressions of CD34 ($p=0.21$), podoplanin ($p=0.18 - 5$ fields; $p=0.28 - 3$ fields) and Ki-67 ($p=0.18$) were not connected with the risk of death due to cancer. It has been proven that only the high histological grading ($p=0.002$) and higher concentration of SCC antigen in the serum after the treatment ($p=0.014$) were connected with the higher risk of death due to cervical cancer. Relation between initial concentration of SCC antigen and the level of SCC-Ag concentration change after the treatment, and the risk of death due to cervical cancer has not been proved. Relation between high number of miscarriages and higher death risk due to cervical cancer was on the border of statistical significance ($p=0.05$). Statistically significant factor prolonging the survival was to receive a standard radiotherapy protocol ($p=0.012$).

Other treatment protocols were related to shortening the survival rate. Longer survival rate after receiving 4 sessions of chemotherapy compared with a situation where full dose of chemotherapy was not given ($p=0.25$) was not confirmed. Due to a small size of the tested group multi-factor analysis was not conducted.

Following conclusions were drawn from the conducted research:

1. No relationship was shown between expressions of CD34, Ki-67 and podoplanin in the cervical tumor and histological grading, staging and other assessed parameters in a locally advanced squamous cell cervical cancer. Expression of CD34 expression correlated positively with expression of Ki-67.
2. During the follow-up one in four patient in the study group was diagnosed with cancer recurrence which in 11 out of 14 cases led to patient's death.
3. Level of CD34, podoplanin and Ki-67 expressions in the tumor was not connected with the recurrence or death risk due to cervical cancer.
4. The factor influencing recurrence of cancer and death due to cervical cancer was high concentration of SCC antigen in the patients' serum 6 weeks after the treatment. Similar relations were not connected to the concentration of SCC antigen before the treatment.
5. The risk of cervical cancer recurrence increased with the high grading of cervical tumor and with the higher number of miscarriages. However, higher death risk concerned patients with higher histological grading of cervical cancer and patients who did not received the planned full dose of the teloradiotherapy with HDR brachytherapy.