

KORELACIJA BIOLOŠKIH MARKERA SA ODGOVOROM NA PREOPERATIVNU RADIOTERAPIJU LOKALNO ODMAKLOG NEINFLAMATORNOG KARCINOMA DOJKE

UVOD

Lokalno odmakli karcinom dojke predstavlja heterogenu grupu tumora različite kliničke manifestacije i biološkog ponašanja. Klinički se manifestuje u vidu tumora većeg od 5 cm (T3) ili tumora koji zahvata kožu ili zid grudnog koša (T4) i/ili fiksiranih limfnih čvorova u pazušnoj jami (N2), uvećanih limfnih čvorova u infraklavikularnoj, supraklavikularnoj jami i duž arterije mamarije interne (N2, N3). (1) Prema TNM klasifikaciji Međunarodne unije za borbu protiv raka (7-mo izdanje), odnosno stadijuma bolesti, u ovu grupu spadaju pacijenti u IIIA stadijumu (T0-2, N2 i T3, N1-2), IIIB stadijumu (T4, N0-2) i IIIC stadijumu (bilo koji T, N3). (2) Pored toga u lokalno odmakle tumore se svrstavaju i pacijenti koji spadaju u deo IIB stadijuma (T3, N0).

Lečenje lokalno odmaklog karcinoma dojke danas je kombinovano i podrazumeva primenu indukciono hemioterapije, nakon čega sledi lokalna terapija – hirurgija i/ ili radioterapija (RT).

Cilj radioterapije, kao jednog od tri glavna modaliteta lečenja karcinoma dojke je postizanje bolje lokalne kontrole bolesti, bilo da se primenjuje kao postoperativna kod ranog i operabilnog karcinoma dojke, bilo kao preoperativna kod lokalno odmakle bolesti. Uprkos tome što je pokazano da postoperativna RT značajno smanjuje verovatnoću pojave lokalnog recidiva, i dalje postoji jedan konstantan procenat pojave recidiva, nakon poštodne operacije i radioterapije od oko 1% godišnje.(3) Takodje, na osnovu literaturnih podataka znamo da je sama radioterapija, kao jedini modalitet lečenja kod lokalno odmaklih tumora dojke imala relativno nezadovoljavajuće rezultate u pogledu lokalne kontrole bolesti i ukupnog preživljavanja.(4) Pojava lokalnog recidiva nakon sprovedene RT objašnjava se radiorezistencijom tumora, čiji mehanizam još uvek nije sasvim poznat.

Lokoregionalna kontrola i uopšte ishod bolesti zavise pre svega od standardnih prognostičkih parametara kao što su veličina tumora, gradus tumora, nodalni status, godine starosti. Pored toga postoje prognostički i prediktivni biološki markeri, koji mogu da utiču na lokalnu kontrolu i istovremeno da ukažu na odgovor na odgovarajuću terapiju, a u koje spadaju hormonski receptori za estrogen (ER) i progesteron (PR), marker proliferacije Ki-67 i receptor humanog epidermalnog faktora rasta-2 (HER-2).(5) Medjutim nešto manje su poznati faktori koji potencijalno mogu da utiču na lokalnu kontrolu bolesti, a delom su u vezi i sa radiorezistencijom karcinoma dojke, u koje spadaju insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R), B-cell leukaemia/lymphoma (Bcl-2) i p53.(6,7,8)

U ovoj studiji bi se analizirali sledeći biološki markeri: ER, PR, HER-2, IGF-1R, Ki-67, P53 i Bcl-2.

Hormonski receptori za estrogen (ER) i progesteron (PR) su intraćelijski steroidni receptori i predstavljaju dobro poznate, standardne prognostičke faktore, kao i prediktivne faktore odgovora na hormonsku terapiju. Poznato je da pozitivni receptorski status ukazuje na bolju prognozu bolesti.(6) Manje je jasno da li ER i PR mogu da predvide i odgovor na radioterapiju. Novija istraživanja su pokazala da pacijenti sa niskom ekspresijom ER imaju veću korist od postoperativne RT u pogledu preživljavanja bez bolesti (DFS- disease free survival) u odnosu na pacijente sa visokom ekspresijom ER. (9)

Receptor humanog epidermalnog faktora rasta –2 (HER-2), poznat kao c-erbB2 ili neu, nalazi se na površini ćelije, a predstavlja transmembranski glikoprotein čija unutrašnja domena ima aktivnost tirozin kinaze. Pokazano je da je HER2 amplifikacija gena ili overekspresija receptora udružena sa većim tumorskim gradusom, nedostatkom ER receptora, većim nivoom indikatora tumorske proliferacije kao što je Ki-67 i lošijom prognozom, odnosno, sa agresivnom prirodom bolesti i tumorskog rasta.(7,8,10). U eksperimentima na ćelijskim kulturama pokazana je povećana radiorezistencija u ćelijama koje imaju povećanu ekspresiju HER-2 receptora.(7) Isto tako i neke kliničke studije su pokazale da pacijenti sa lokalnim recidivom nakon poštene operacije kao i nakon mastektomije imaju veću verovatnoću da su HER-2 pozitivni.(11,12) U seriji pacijenata sa lokalno odmaklim karcinomom dojke koji su tretirani kombinovanim lečenjem hemioterapijom i radioterapijom, pokazano je da je niska ekspresija HER-2 udružena sa boljim odgovorom na terapiju. (13)

Ki-67 je nuklearni antigen koji se nalazi u ćeliji koja je u proliferativnoj fazi, te stoga predstavlja marker ćelijske proliferacije. (10) Pokazano je da pacijenti sa povećanom ekspresijom Ki-67 u više od 50% ćelija imaju visok rizik za razvoj relapsa bolesti i lošiju prognozu. (10) Pored toga povećana ekspresija Ki-67 udružena je i sa negativnim ER i pozitivnim HER-2 nalazom. (14) Sa druge strane, studije su pokazale da Ki-67 ima i prediktivnu ulogu u odgovoru na neoadjuvantnu HT, odnosno da je visok nivo Ki-67 udružen sa boljim odgovorom na terapiju. (15) Takođe, neka istraživanja su procenjivala ulogu Ki-67 i u predikciji odgovora na radioterapiju. (7)

Insulin-like growth factor-1 receptor (IGFR-1R) je transmembranski recetor koji igra važnu ulogu u kontroli ćelijskog rasta i maligne transformacije i važan je inhibitor apoptoze.(7,8) U eksperimentalnim studijama pokazano je da povećana ekspresija IGF-1R u ćelijskim kulturama može da bude povezana sa radiorezistencijom. (7) Klinički značaj ovakvog otkrića je ispitivan na tumorskim uzorcima karcinoma dojke, gde je pokazano da je visok nivo IGF-1R povezan sa pojavom recidiva u dojci nakon tumorektomije i postoperativne RT. (16)

Bcl-2 (B-cell leukaemia/lymphoma) je protoonkogen koji inhibira apoptozu izazvanu hemioterapijom i radioterapijom i na taj način pospešuje ćelijsko preživljavanje. (7,10) Većina studija je pokazala da je povećana Bcl-2 ekspresija udružena sa nižim rizikom za relaps bolesti i

boljim ukupnim preživljavanjem, dok su pojedine studije pokazale suprotno, da je povećana ekspresija Bcl-2 povezana sa većim procentom lokalnog recidiva. (9,17) Sa druge strane povećana ekspresija Bcl-2 teoretski je povezana sa opadanjem apoptotskog odgovora na radioterapiju i povećanjem radiorezistencije.(7) Overekspresija Bcl-2 omogućuje tumorskim ćelijama sa ekstenzivnim oštećenjem prouzrokovanim zračenjem da nastave sa proliferacijom, što se klinički manifestuje kao radiorezistencija.

P53 je gen lokalizovan na hromozomu 17p i igra vaznu ulogu u kontroli ćelijskog rasta i apoptozi. (7,8) Povećana ekspresija p53 je obično udružena sa lošom prognozom bolesti, odnosno sa visokim gradusom tumora, negativnim ER, kraćim DFS i OS i hemio i radiorezistencijom.(7,8,18) Veruje se da gubitak kontrole ćelijskog ciklusa, reparacije DNK i apoptoze vodi ka radiorezistenciji. (8) P53 je važan factor u prognozi lokalne kontrole bolesti i odgovora na radioterapiju. Ispitivanje p53 statusa kao prediktora odgovora na kombinovanu hemio i radioterapiju kod lokalno odmaklog karcinoma dojke sugerisalo je da je nedostatak ekspresije p53 bilo u značajnoj korelaciji sa odgovorom na primenjenu terapiju. (19)

RADNA HIPOTEZA

Radna hipoteza podrazumeva da će se pokazati da ispitivani biološki markeri (ER, PR, HER2, IGF-1R, p53, Bcl2, KI-67) imaju uticaj na odgovor na primenjenu preoperativnu zračnu terapiju lokalno odmaklog karcinoma dojke, odnosno da povećana ekspresija ovih markera dovodi do radiorezistencije.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitivanje povezanosti bioloških markera ER, PR, IGF-1R, HER2, p53, Bcl2, Ki-67 u odnosu na:
 - a) inicijalne karakteristike pacijenata i tumora (starost, menopauzalni status, TNM klasifikaciju, patohistološki tip tumora, gradus tumora, zahvaćenost limfnih čvorova)
 - b) odgovor na preoperativnu RT (kompletna regresija CR, parcijalna regresija PR i stabilizacija bolesti SD)
2. Ispitivanje povezanosti promene ekspresije bioloških markera (ER, PR, IGF-1R, HER2, p53, Bcl2, KI-67) tokom preoperativne RT na odgovor na RT
3. Ispitivanje povezanosti odgovora na preoperativnu RT sa ukupnim preživljavanjem (OS) I preživljavanjem bez znakova bolesti (DFS)

MATERIJAL I METODE

Istraživanje bi u okviru kohortne opservacione studije, obuhvatilo 134 pacijenata sa lokalno odmaklim karcinomom dojke (IIa i IIb stadijum) kod kojih je u periodu od 1997 – 2000 godine u Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije sprovedena preoperativna RT (TD 45 Gy u 15 frakcija na predeo dojke i regionalnih limfatika), nakon prethodno učinjene biopsije tumora dojke. Kod svih pacijenata je 6 nedelja po završenom zračenju učinjena radikalna mastektomija i data odgovarajuća adjuvantna terapija (hemioterapija ili hormonoterapija – u zavisnosti od prognostičkih parametara, a prema tadašnjem važećem protokolu za lečenje malignih tumora).

Analiza bioloških markera vršila bi se na materijalu biopsiranog tumora pre sprovođenja RT i na materijalu tumora nakon sprovedene RT dobijenog posle mastektomije (osim za one tumore kod kojih je preoperativna RT dovela do kompletne regresije

Materijal na kome bi se odredjivali biomarkeri: parafinski kalupi od biopsije tumora pre radioterapije i uzoraka tumora posle radioterapije i mastektomije.

Odredjivanje ER i PR radiće se imunohistohemijskom (IHH) metodom iz parafinskih kalupa. HER-2 status će se odredjivati IHH metodom, a u sličaju da je IHH analiza pokazala da je HER-2: 2+ , uradila bi se hromogena *in situ* hibridizacija (CISH) radi odredjivanja da li postoji amplifikacija HER-2 gena.

Potencijalni markeri rezistencije na radioterapiju koji će se odredjivati na genskom nivou su: IGF-1R ekspresija, Bcl-2 ekspresija, P53 ekspresija i P53 mutacije. Ekspresije IGF-1R, Bcl-2 i p53 biće kvantifikovana Real-Time PCR-om. Iz parafinskih kalupa prvo će se izolovati RNK, koja će se potom prevesti u cDNK metodom reversne transkripcije. cDNK je polazni materijal za kvantitativni Real-Time PCR, TaqMan metodom. Mutacije u p53 genu odredjivaće se u uzorcima DNK izolovane iz parafinskih kalupa, PCR-om i direktnim sekvenciranjem.

Biološki markeri bi se odredjivali tokom 2011.g i 2012. godine.

Kriterijumi evaluacije odgovora na preoperativnu radioterapiju:

Radila bi se histopatološka procena odgovora primarnog tumora na preoperativnu RT

Kompletan odgovor (pCR): odsustvo malignog tkiva na materijalu od mastektomije, ili prisustvo pojedinačnih malignih ćelija ili fokusa DCIS.

Približno kompletan odgovor (pNCR): prisutan rezidualni tumor manji od 5 mm

Parcijalan odgovor (pPR): evidentna redukcija tumora ili oštećenja ćelija, rezidualni tumor veći od 5 mm

Nema promena (pNC): nema promena koje bi sugerisale dejstvo RT

STATISTIČKA ANALIZA

Predviđena statistička metodologija obuhvataće:

- opis parametara od značaja (frekvencije, procenti, prosek, medijana, standardna devijacija (SD) i opseg)
- ispitivanje saglasnosti uzoračkih raspodela sa normalnom raspodelom (testovi: Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk)
- ispitivanje povezanosti faktora od značaja primenom statističkih testova (Pearson χ^2 test, Fisher exact test, Wilcoxon rank sum test, t-test, Wilcoxon signed-rank test i drugi parametarski i/ili neparametarski testovi primenljivi u zavisnosti od prirode i kvaliteta podataka)
- za analizu ukupnog preživljavanja (OS) i preživljavanja bez znakova bolesti (DFS) u odnosu na parametre od značaja, koristiće se Survival Analysis metodologija (Kaplan-Meier product-limit metoda, Log-rank test)
- za identifikaciju faktora od značaja za terapijski odgovor na preoperativnu RT, ukupno preživljavanje (OS) i i preživljavanje bez znakova bolesti (DFS), koristiće se regresiona analiza (logistička regresija odnosno Cox-ov proporcionalni hazardni model)
- Za nivo statističke značajnosti biće usvojena vrednost $\alpha=0.05$

PROCENA KANDIDATA O POTENCIJALNOM NAUČNOM DOPRINOSU

Biološki markeri koji utiču na odgovor na RT u lečenju karcinoma dojke do sada nisu mnogo ispitivani, jer se RT često primenjuje uz sistemsku terapiju koja takodje utiče na OS i DFS.

Na osnovu literaturnih podataka može se videti da su biološki markeri potencijalne radiorezistencije karcinoma dojke do sada uglavnom ispitivani kod ranog karcinoma i pacijenata koji su primali adjuvantnu hemioterapiju i postoperativnu zračnu terapiju nakon poštredne operacije ili mastektomije. Takodje je vrlo malo podataka o ispitivanju bioloških markera kod lokalno odmakle bolesti gde je lečenje bilo kombinovano sa inicijalnom hemioterapijom a potom radioterapijom. Pored toga, do sada je uglavnom ispitivana veza bioloških markera i odgovora na primenjenu hemioterapiju.

Preoperativna RT kao jedini vid preoperativnog lečenja lokalno uznapredovalog karcinoma dojke koja se kod nas rutinski primenjivala u ranijem periodu, nije bila široko rasprostranjena u svetu, tako da praktično ne postoje grupe pacijenata u okviru kojih bi se moglo ispitivati uticaj markera na RT bez upliva drugih terapijskih modaliteta.

Time bi rezultati ovog istraživanja mogli da doprinesu boljoj selekciji pacijenata prilikom odlučivanja o sprovođenju radioterapije kako kod lokalno odmakle bolesti, tako i prilikom odluke o sprovođenju postoperativne radioterapije bilo nakon mastektomije bilo nakon poštedne operacije ranog karcinoma dojke.

LITERATURA:

1. Chia S, Swain SM, Byrd DR et al. Locally advanced and inflammatory breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:786-90
2. International Union Against Cancer (UICC). Breast tumours in TNM Classification of Malignant Tumours, 7-th edition. Sobin LH, Gospodarowich MK, Wittekind Ch (eds). Wiley-Blackwel, UK, 2009, pp 181-93
3. Kunkler I. Radiation resistance in breast cancer. *Advances in breast cancer*. Sep 1, 2009;10-15
4. Sharon HG. Update on locally advanced breast cancer. *The Oncologist*. 2003;8:521-530
5. Haffty BG and Buchholz TA. Molecular predictors of locoregional recurrence in breast cancer: Ready for prime time? *J Clin Oncol*. 2010;28:1627-29
6. Reister O, Milas L and Ang KK. Use of molecular biomarkers for predicting the response to radiotherapy with or without chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007;25:4075-83
7. Haffty BG and Glazer PM. Molecular markers in clinical radiation oncology. *Oncogene*. 2003;22:5915-25
8. Jameel JKA., Rao VSR, Cawkwell L, Drew PJ. Radioresistance in carcinoma of the breast. *The Breast*. 2004,13(6):452-460
9. Gustavson MD, Petrillo SK, Graves L et al. Quantitative and standardized measurement of estrogen receptor predicts response to radiation therapy in breast cancer. *Cancer Research*. 2010;70(24 suppl.):131s (abstr.PD10-08)
10. Estava FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004,6:109-118
11. Millar EKA, Graham PH, O'Toole SA et al. Prediction of local recurrence, distant metastases and death after breast-conserving therapy in early-stage invasive breast cancer using a five-biomarker panel. *J Clin Oncol* 2009;27:4701-8
12. Kyndi M, Sorensen FB, Knudsen H et al. Estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2 and response to postmastectomy radiotherapy in high-risk breast cancer: The Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*. 2008;26:1419-26

13. Formenti SC, Spicer D, Skinner K et al. Low HER-2/NEU gene expression is associated with pathological response to concurrent paclitaxel and radiation therapy in locally advanced breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002;52:397-405
14. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM et al. Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol.* 2010;11:174-83
15. Guarneri V, Piacentini F, Ficarra G et al. A prognostic model based on nodal status and Ki-67 predicts the risk of recurrence and death in breast cancer patients with residual disease after preoperative chemotherapy. *Annals of Oncology.* 2009;20:1193-8
16. Turner BC, Haffty BG, Narayanan L et al. Insulin-like growth factor-1 receptor overexpression mediates cellular radioresistance and local breast cancer recurrence after lumpectomy and radiation. *Cancer Res.* 1997;57:3079-3083
17. Yang Q, Moran MS et Haffty BG. Bcl-2 expression predicts local relapse for early-stage breast cancer receiving conserving surgery and radiotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2009;115:343-8
18. Marchetti P, Cannita K, Ricevuto E. et al. Prognostic value of p53 molecular status in high-risk primary breast cancer. *Annals of oncology.* 2003;14:704-708
19. Formenti SC, Dunnington G, Uzieli B. et al. Original P53 status predicts for pathological response in locally advanced breast cancer patients treated preoperatively with continuous infusion 5-fluorouracil and radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997;39:1059-68