

## Ocena wartości prognostycznej ekspresji kombinacji wybranych biomarkerów u chorych na raka szyjki macicy leczonych napromienianiem i cisplatyną

Małgorzata Klimek

**Cel pracy.** Celem przeprowadzonych badań była ocena prognostycznego znaczenia ekspresji wybranych biomarkerów u chorych na nieoperacyjnego raka szyjki macicy leczonych napromienianiem lub napromienieniem i cisplatyną.

**Materiał i metody.** Przedmiotem retrospektywnej analizy była grupa 186 chorych leczonych w latach 2003–2008. Ocena histologiczna uwzględniła takie parametry, jak: typ histologiczny, obecność atypowych mitoz i indeks mitotyczny. W ocenie ekspresji EGFR, COX-2, Bax, Bcl2, P16, dwóch domen białka P53, Ki-67 i antygeny komórek śródbłonki naczyniowego CD34 wykorzystano metodę immunohistochemiczną. Oceniono także znaczenie ploidii komórek guza oraz frakcji komórek w fazach S i S+G2M, a także odsetka komórek aneuploidalnych w cytofluorymetrze przepływowym. Oceniono wpływ rokowniczy amplifikacji genu EGFR metodą FISH. Ponadto oceniono znaczenie poziomu antygeny SCC po zakończeniu leczenia.

**Wyniki.** Analiza jednocechowa wykazała, że wiek chorych i czas leczenia jako zmienne ciągle miały wpływ na przeżycia bezobjawowe, ponadto prognostyczne znaczenie miał stopień zaawansowania, a także poziom Hb przed rozpoczęciem leczenia i w trakcie jego trwania. Po przekroczeniu ustalonego punktu odcięcia istotny, niekorzystny wpływ na przeżycia bezobjawowe miały następujące markery: ekspresja Ki-67, indeks mitotyczny, odsetek komórek w fazie S+G2M, odsetek komórek aneuploidalnych oraz obecność atypowych mitoz. Wykazano także niekorzystny wpływ braku normalizacji poziomu SCC-Ag po zakończeniu leczenia. W analizie wieloczynnikowej wzrost ryzyka nawrotu, rozsiewu lub zgonu dotyczył chorych, których guz cechował się gęstością mikronaczyń i ekspresją Ki-67 przekraczającymi ustalone punkty odcięcia oraz u których utrzymywał się po zakończeniu leczenia onkologicznego podwyższony poziom SCC-Ag.

**Wnioski.** 1. Przeprowadzona analiza potwierdziła znaczenie klasycznych czynników prognostycznych: zaawansowania raka szyjki macicy według klasyfikacji FIGO i czasu leczenia, a także wieku. 2. Informacje o gęstości mikronaczyń i ekspresji Ki-67 w guzie pierwotnym przed leczeniem, a także o poziomie SCC-Ag po zakończeniu leczenia onkologicznego są pomocne w ocenie ryzyka wystąpienia niepowodzenia leczenia.

### Evaluation of the prognostic value of the expression of a combination of selected biomarkers in patients with cervical cancer treated with radiotherapy and cisplatin

**Aim.** The aim of this study was to evaluate the prognostic significance of the expression of selected biomarkers in patients with inoperable cancer of the cervix treated with irradiation only or irradiation and cisplatin.

**Material and methods.** The retrospective analysis included 186 patients who were treated between 2003 and 2008. Histological evaluation took into consideration parameters such as histological type, the presence of atypical

Klinika Ginekologii Onkologicznej

Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

Praca stanowi część rozprawy habilitacyjnej pod tytułem: Ocena wartości predykcyjnej i prognostycznej ekspresji kombinacji wybranych biomarkerów u chorych na raka szyjki macicy leczonych napromienianiem i cisplatyną.

Praca została wykonana w ramach projektu badawczego Nr: N N401 077137.

mitosis and mitotic index. In the assessment of EGFR expression, COX-2, Bax, Bcl2, P16, two domains of P53, Ki-67, and vascular endothelial cell antigen CD34 the immunohistochemical method was used. The importance of ploidy of tumour cells and the S phase and S+G2M phase fractions and the percentage of aneuploid cells in the flow cytometer has been assessed. The influence of prognostic significance of EGFR gene amplification by the FISH test has been assessed. The importance of SCC antigen level after treatment was also analysed.

**Results.** In univariate analysis the following factors had an influence on DFS: age, total treatment time (as continuous variables), FIGO stage and Hb levels before and during treatment. The following markers beyond the established cut-off, had a significant, adverse effect on DFS: Ki-67, MI, S+G2M phase cells fraction, fraction of aneuploid cells and presence of atypical mitosis. Also, the lack of normalisation of SCC-Ag level after oncological treatment appeared to be a significant prognostic factor. In multivariate analysis, increased risk of recurrence, metastatic spread or death, affected patients whose tumour was characterised by microvessel density and expression of Ki-67 exceeding the established cut-off points, and patients with elevated the SCC-Ag level after the completion of oncological treatment. The importance of SCC antigen level after oncological treatment was also analysed.

**Conclusions.** 1. The analysis confirmed the importance of the classical prognostic factors: FIGO stage, total treatment time and age. 2. Information about microvessel density and Ki-67 expression in the primary tumour before treatment as well as the level of SCC-Ag after completion of oncological treatment are helpful in assessing the risk of treatment failure.

NOWOTWORY Journal of Oncology 2015; 65, 2: 111–121

**Słowa kluczowe:** rak szyjki macicy, radiochemioterapia, czynniki prognostyczne

**Key words:** cervical cancer, radiochemotherapy, prognostic factors, gene expression

## Wstęp

Radiochemioterapia stosowana od kilkunastu lat u chorych na raka szyjki macicy w stopniach zaawansowania IB2-IVA przyczyniła się do poprawy przeżyć pięcioletnich o kilkanaście procent w porównaniu z samą radioterapią, przy czym poprawa dotyczy przede wszystkim chorych w stopniach zaawansowania do IIA, w wyższych stopniach nie jest już tak oczywista. Istotnym problemem klinicznym jest nawrót, do którego dochodzi u ponad 20% chorych, jak również przetrwały u części chorych po radiochemioterapii nowotwór. Dalsza poprawa wyników leczenia chorych na miejscowo zaawansowanego raka szyjki macicy wiąże się z wprowadzeniem nowych leków, w tym ukierunkowanych molekularnie, a także nowymi technikami napromieniania. Znajomość czynników prognostycznych przed leczeniem pozwala określić ryzyko nawrotu, rozszewu i zgonu z powodu nowotworu niezależnie od zastosowanej metody leczenia. Systematyczne badania kontrolne po leczeniu, zwłaszcza u chorych z niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi, mogą przyczynić się do wcześniejszego wykrycia niepowodzenia i rozważenia leczenia chirurgicznego, systemowego, rzadziej powtórnego napromieniania. Znane od dawna czynniki prognostyczne u chorych na nieoperacyjnego raka szyjki macicy to: stan ogólny, anemia, zaawansowanie nowotworu, średnica nacieku nowotworowego, przerzuty do węzłów chłonnych. Wyniki prowadzonych od szeregu lat prac klinicznych oceniających znaczenie prognostyczne czynników molekularnych są rozbieżne. Jak do tej pory żaden z badanych markerów molekularnych nie

wszedł do panelu standardowych badań diagnostycznych u chorych na raka szyjki macicy. Celem pracy była retrospektywna ocena wpływu na przeżycia bezobjawowe wybranych biomarkerów u 186 chorych na nieoperacyjnego raka szyjki macicy leczonych napromienianiem z cisplatyną lub bez cisplatyny. Oceniono wpływ następujących parametrów: wieku, stopnia zaawansowania według klasyfikacji FIGO, czasu leczenia, poziomu hemoglobiny przed leczeniem, jak również w trakcie leczenia i poziomu SCC-Ag po zakończeniu leczenia onkologicznego. Ponowna ocena histologiczna uwzględniała między innymi takie parametry, jak: typ histologiczny, obecność atypowych mitoz i MI (indeks mitotyczny). Wykonano badania immunohistochemiczne w celu oznaczenia ekspresji następujących biomarkerów: P53, P16, EGFR, Cox-2, Bax, Bcl-2, antygenu proliferacji komórkowej Ki-67, MVD (gęstość mikronaczyń). Przeprowadzono fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* dla oceny amplifikacji genu EGFR1 oraz ploidii chromosomu 7. Przeprowadzono badania cytofluorometryczne dla określenia zawartości DNA w komórkach guza pierwotnego oraz oceny frakcji komórek w fazie S i frakcji komórek w fazie S+G2M.

## Materiał i metody

Przedmiotem analizy było 186 chorych na nieoperacyjnego raka szyjki macicy leczonych radykalnie napromienianiem z udziałem lub bez udziału cisplatyny w krakowskim oddziale Centrum Onkologii — Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie w latach 2003–2008. Analizę histopatologiczną, badania immunohistochemiczne i cy-

**Tabela I.** Przeciwciała użyte do oceny ekspresji badanych biomarkerów

Przeciwciało przeciwno	Rozcieńczenie	Nr katalogowy	Firma
COX 2	1: 100	M 3617	DAKO
P16	RTU	9511	CINtec
Bax	1: 100	A 3533	DAKO
Bcl 2	1: 80	NCL-bcl-2	Novocastra
P53 BP	1: 50	NCL-p53-BP	Novocastra
P53 1801	1: 40	NCL-p53-1801	Novocastra
CD 34	1: 400	MS-363-P	Lab Vision
EGFR	RTU	K 1492	DAKO
Ki-67	1: 100	M 7240	DAKO
VEGF	1: 100	NCL-L- VEGFR-3	Novocastra

tofluorymetryczne przeprowadzono w oparciu o dostępne archiwalne kostki parafinowe, w znacznej części wy pożyczone z 18 pracowni histopatologicznych z Krakowa i Małopolski. Do przeprowadzenia ponownej oceny histologicznej, a także badań immunohistochemicznych, testu FISH, badań cytometrycznych zakwalifikowano materiał 186 chorych. Ocena zaawansowania nowotworu ustalana była na podstawie badania ginekologicznego oraz w oparciu o wyniki badań obrazowych: zdjęcia rentgenowskiego klatki piersiowej, ultrasonografii i/lub tomografii komputerowej i/lub rezonansu magnetycznego. U 125 chorych (67,2%) przeprowadzono napromienianie od zewnątrz techniką 3D konformalną, u 61 chorych (32,8%) napromienianie w technice 2D. Analizowaną grupę chorych napromieniano dawką 50 Gy, podaną w 25 frakcjach na obszar miednicy mniejszej, w technice czteropolowej. Chemioterapię (cisplatyna w dawce 40 mg/m<sup>2</sup> podawana raz w tygodniu) w trakcie napromieniania od zewnątrz przeprowadzono u 131 chorych (70,4%), u 55 chorych (29,6%) napromienianie prowadzone było bez chemioterapii. W grupie otrzymujących cisplatynę 121 chorych (84,7%) otrzymało od 4 do 6 serii chemioterapii, 20 chorych (15,3%) z powodu złej tolerancji otrzymało 3 lub mniejszą ilość serii chemioterapii. U 171 chorych (91,9%) stosowano brachyterapię o niskiej mocy dawek (LDR), u 11 chorych (5,9%) brachyterapię o wysokiej mocy dawki (HDR) i u 4 chorych (2,2%) — brachyterapię z wykorzystaniem źródła PDR (*pulse dose rate*: napromienianie impulsami z zaplanowaną przerwą).

### Metodyka badań immunohistochemicznych

Badania przeprowadzono w Pracowni Immunohistochemicznej i Technik Specjalnych Zakładu Patologii Nowotworów (dr n. med. Anna Kruczak). Badania immunohistochemiczne wykonano na skrawkach utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie. Preparaty odparafinowano w ksylenie, uwadniano w malejących stężeniach etanolu, po czym blokowano endogenną peroksydazę w 2-procentowym nadtlenku wodoru. Po wypłukaniu preparaty inkubowano

w buforze cytrynianowym o pH 6,0, w kuchenie mikrofalowej o mocy 60 W, 2 × po 10 min. Preparaty wystudzone, wypłukano w buforze TRIS, po czym blokowano w surowicy blokującej przez 10 min w temp. pokojowej. Z preparatów odsączano nadmiar buforu i nakrapiano roztwory surowic pierwotnych w rozcieńczeniach, jak podano w tabeli I. Preparaty płukano w buforze TRIS i nakrapiano surowice wiążące z UltraVision Detection System Anti Polyvalent, HRP RTU LabVision i przeprowadzono inkubację zgodnie z protokołem. Preparaty wypłukano i nakrapiano roztwór DAB (diaminobenzidyn). Przeprowadzono inkubację, kontrolując wynik barwienia w mikroskopie świetlnym. Preparaty wypłukano w wodzie destylowanej, podbarwiano hematoksyliną, odwadniano i zamykano w balsamie kanadyjskim. Oceny reakcji barwnych dokonywało dwóch niezależnych patologów. Przy ocenie ekspresji bcl-2, bax, COX-2, EGFR i P16 oceniano intensywność reakcji w skali od 0 do 3 (0 — brak reakcji, 1 — reakcja słaba, 2 — umiarkowana i 3 — silna) oraz odsetek zabarwionych komórek. Przy ocenie reakcji immunohistochemicznych z przeciwciałem przeciwko białku P53 wykorzystano skalę Remmelego i Stegnera [1]. Przy ocenie ekspresji antygenu proliferacyjnego Ki-67 liczono odsetek pozytywnie zabarwionych jąder komórkowych. Do oceny gęstości mikronaczyń w guzie wykorzystano — jako marker komórek endotelialnych — przeciwciało anti-CD34 i metodę streptawidynowo-biotynową. Średnia wartość całkowitej liczby naczyń krwionośnych typu kapilarnego była liczona w 5 polach widzenia pod powiększeniem 100 × (ok. 1,43 mm<sup>2</sup>). Każdy poprzeczny przekrój przez naczynie wyznakowane CD34 był traktowany jako pojedyncze naczynie. W polach widzenia, w których znajdowała się martwica, i w polach bez utkania nowotworu naczynia nie były liczone (tab. I).

### Metodyka badania FISH (Fluorescent in Situ Hybridization)

Badania przeprowadzono w Pracowni Immunohistochemicznej i Technik Specjalnych Zakładu Patologii Nowotwo-

rów (dr n. med. Anna Kruczak). Badania FISH (*Fluorescent in Situ Hybridization*) wykonano na skrawkach grubości 4  $\mu\text{m}$  uzyskanych z tkanek utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie. Skrawki odparafinowano w ksylenie, uwadniano w malejącym stężeniu etanolu, a następnie suszono. Preparaty inkubowano w 0,2 NHCL przez 20 minut w temperaturze pokojowej, po czym wypłukano i inkubowano w *pretreatment solution* przez 30 minut w temperaturze 80°C. Po wypłukaniu w *wash buffer* inkubowano w roztworze proteazy przez 30 minut w temperaturze 37°C. Preparaty po wypłukaniu suszono i nakładano 10  $\mu\text{l}$  sondy firmy Vysis. Preparaty nakrywano szkiełkiem nakrywkowym, którego brzegi zaklejano klejem. DNA preparatu i sondy poddawano denaturacji poprzez podgrzanie do 80°C w komorze wilgotnej przez 10 minut i całkowitej hybrydyzacji w 37°C. Następnego dnia zdjęto szkiełko nakrywkowe i wypłukano preparaty w *post-hybridization wash buffer* przez 2 minuty w temp. 72°C. Szkiełko wysuszono, nakropiono roztworem DAPI, nakryto szkiełkiem nakrywkowym, a brzegi zamalowano lakierem do paznokci. Preparaty oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym firmy Olympus. Preparaty analizowało dwóch niezależnych obserwatorów. Używając filtrów *spectrum green* i *spectrum orange*, zliczano ilość sygnałów pochodzących od sondy centromerowej (koloru zielonego) oraz ilość sygnałów pochodzących od sondy komplementarnej do genu EGFR1 (koloru czerwonego) w 60 komórkach raka w każdym badanym przypadku. Analiza dotyczyła oceny amplifikacji genu EGFR1 oraz ploidii chromosomu 7. Amplifikację stwierdzano, gdy stosunek liczby kopii genu EGFR1 do liczby kopii centromerów chromosomu 17 był większy od 2. Oprócz amplifikacji oceniano ploidię komórek raka, badając liczbę kopii centromerów chromosomu 7 i odpowiadających im kopii genu EGFR1. Analizowane przypadki oceniano jako raki z disomią, niską i wysoką trisomią, niską i wysoką polisomią.

### **Metodyka badań cytofluorymetrycznych**

Badania wykonano w Pracowni Cytometrii Przepływowej Zakładu Patologii Nowotworów COOK (dr n. med. Bożena Lackowska). Do analizy wykorzystano wycinki z guzów, po wcześniejszej weryfikacji histologicznej. Zawiesinę jąder uzyskano przy wykorzystaniu zmodyfikowanej metody opisanej przez Hedleya i wsp. [2]. Dwa–trzy skrawki parafinowe o grubości 50  $\mu\text{m}$  poddano odparafinowaniu w ksylenie, a następnie uwodnieniu poprzez przeprowadzenie przez szereg alkoholi o malejącym stężeniu. Tak przygotowane skrawki trawiono w 0,5-procentowym roztworze pepsyny przez jedną godzinę i w temperaturze 37°C. Po odwirowaniu, zawiesinę jąder komórkowych inkubowano z jodkiem propydydy, a następnie z rybonukleazą. Próbkę w ciągu 2 godzin analizowano w cytofluorymetrycznym przepływowym FACSCalibur (Becton–Dickinson), wyposażonym w laser argonowy o mocy 15 mW i fali światła wzbudzonego o długości 488 nm. Ploidie oraz proliferację oceniono przy użyciu

programu ModFit. Histogramy pod względem ploidalności klasyfikowano w oparciu o kryteria opisane przez Shankeya i wsp. [3]. Stopień aneuploidii określano poprzez indeks DNA, który zdefiniowany jest jako stosunek natężenia fluorescencji dla komórek w fazie G0/G1 populacji badanej do natężenia fluorescencji dla komórek w fazie G0/G1 populacji komórek prawidłowych. Dla populacji diploidalnej DI wynosi 1,00. Zarówno dla histogramów aneuploidalnych, jak i diploidalnych podawano odsetek komórek w fazach S i S+G2M (indeks proliferacyjny).

### **Metody statystyczne**

Celem analizy statystycznej była ocena wartości prognostycznej wybranych markerów nowotworowych. Za kryterium oceny przyjęto czas przeżycia bezobjawowego. Czas przeżycia obliczano metodą Kaplana–Meiera. Dla oceny istotności stwierdzonych różnic posłużono się testem log-rank. Za poziom istotności statystycznej przyjęto  $p \leq 0,05$ . W celu znalezienia punktów odcięcia dla przedziałów zmienności istotnie różnicujących przeżycia zmienne o charakterze ciągłym zostały przetestowane zarówno jako zmienne ciągłe i jako zmienne skokowe. Analiza krzywych przeżycia dla różnych wartości różnicujących poziomych badanych zmiennych umożliwiła eliminację zmiennych nieistotnych oraz określenie optymalnych wartości odcinających dla zmiennych ciągłych.

Do analizy wpływu wybranych czynników na przeżycie bezobjawowe wykorzystano model proporcjonalnego ryzyka Coxa: w pierwszym etapie zastosowano model jedno-czynnikowy, a następnie model wieloczynnikowy. Analizie poddano czynniki kliniczne i mikroskopowe oraz parametry badane immunohistochemicznie i cytofluorymetrycznie. Selekcji ostatecznych czynników rokowniczych dokonano metodą krokową, na drodze eliminacji czynników nieistotnych. Siłę wpływu badanych parametrów przedstawiono jako wartość relatywnego ryzyka hazardu (RRH). Część badanych zmiennych to zmienne ciągłe. Ich wpływ na przeżycia niekiedy jest istotny dopiero przy przekroczeniu pewnej wartości określonej jako punkt odcięcia (*cut point*). W pierwszym etapie konstruowano modele Coxa, uwzględniając zmienną jako ciągłą, następnie poszukiwano optymalnych punktów odcinających. Moc oddzielająca punktu odcięcia mierzona jest wartością prawdopodobieństwa testowego p testu *log-rank* porównującego krzywe przeżyć odpowiadające wartościom powyżej i poniżej punktu odcięcia.

### **Wyniki**

Wiek chorych wynosił od 29 do 81 lat, średnia wieku wynosiła 55,7; mediana 55 lat. Ponad 60% chorych w momencie rozpoznania raka szyjki macicy nie przekroczyło 60 roku życia. Stan sprawności chorych oceniony w skali Karnofskiego wahał się od 70 do 90 i umożliwiał zakwalifikowanie wszystkich chorych do radykalnego leczenia.

U 68 chorych (36,6%) rozpoznano raka szyjki macicy w stopniach IB i IIA, u 118 (63,4%) w wyższych stopniach zaawansowania według klasyfikacji FIGO.

Pośród 186 przypadków poddanych analizie, raka płaskonabłonkowego rozpoznano u 170 chorych (91,4%), raka gruczołowego u 10 chorych (5,4%) i u 6 (3,2%) raka o mieszanym utkaniu.

W 141 przypadkach (76,2%) stwierdzono obecność atypowych mitoz. Wartość indeksu mitotycznego wahała się od 3,0 do 180. Wartości średnia i medialna indeksu mitotycznego wynosiły odpowiednio 40,1 i 38,0.

U 121 chorych (65,1%) poziom hemoglobiny przed rozpoczęciem leczenia wynosił  $\geq 12$  g/dl, u pozostałych 65 (34,9%) był niższy. Dla poziomu hemoglobiny w trakcie leczenia ustalono punkt odcięcia na poziomie 11 g/dl. U 116 chorych (62,4%) poziom Hb w trakcie leczenia był  $\geq 11$  g/dl, u 70 (37,6%) wynosił poniżej 11 g/dl. Poziom SCC-Ag w surowicy oznaczono u 84 chorych (45,2%).

### **Wyniki oceny ekspresji biomarkerów**

Ekspresję epitopu BP białka P53 stwierdzono u 158 spośród 182 (86,8%), brak ekspresji w 24 przypadkach (13,2%). U 123 chorych (67,5%) ekspresję epitopu BP oceniono na 2–6, u pozostałych 35 chorych (19,3%) na 9–12 w skali Remmelego.

Ekspresję epitopu 1801 białka P53 stwierdzono u 111 spośród 182 chorych (61,4%), brak ekspresji u 71 (39%). U 104 chorych (57,2%) ekspresję epitopu 1801 oceniono na 2–6, u pozostałych 7 (3,8%) na 9–12 w skali wspomnianej powyżej.

Ekspresję białka P16 oceniono u 178 chorych. U 6 pacjentek (3,3%) stwierdzono brak ekspresji, u 40 (22,5%) wystąpiła reakcja głównie cytoplazmatyczna, u 132 chorych (74,2%) jądrowo/cytoplazmatyczna.

Ekspresję Bcl 2 oceniono u 182 chorych. Brak ekspresji stwierdzono u 145 chorych (79,7%). Reakcję pozytywną, o dominującym średnim stopniu intensywności wykazano u 37 chorych (20,3%). Procent komórek wykazujących ekspresję Bcl 2 wahał się od 1 do 100%. Ekspresję Bax oceniono u 181 chorych. Pozytywną reakcję wykazano u 54 chorych (29,8%), negatywną u 127 chorych (70,2%). Odsetek komórek wykazujących ekspresję Bax wahał się od 10 do 100. Silną intensywność reakcji stwierdzono u 29 chorych (16%), umiarkowaną u 13 (7,2%), słabą u 12 chorych (6,6%). W uwagi na niewielką liczebność grupy z ekspresją Bcl 2 i Bax w dalszej analizie brano pod uwagę każdy stopień intensywności reakcji barwnej i procent komórek wykazujących ekspresję białek.

Ekspresję EGFR oceniono u 182 chorych. Obecność białka receptorowego EGFR stwierdzono u 164 chorych (90,1%), brak obecności białka stwierdzono u 18 chorych (9,9%). Dominował umiarkowany stopień nasilenia reakcji barwnej, z tego względu brano pod uwagę jedynie odsetek komórek

wykazujących ekspresję EGFR. Średni odsetek komórek wykazujących ekspresję EGFR wynosił 56,7%, mediana 60,0%.

Ekspresję Cox-2 oceniono u 182 chorych. Pozytywną reakcję stwierdzono u 140 chorych (76,9%), brak ekspresji Cox 2 stwierdzono u 42 chorych (23,1%). Średni odsetek komórek wykazujących ekspresję COX-2 wynosił 31,8; mediana 20,0%. Większość reakcji barwnych prezentowała średni stopień intensywności.

Gęstość mikrokapilar (MVD) oceniono u 146 chorych (78,5%). Liczba naczyń wahała się od 14,3 do 146,6. Średnia wynosiła 50,1; mediana 44,5.

Ekspresję antygenu proliferacyjnego Ki-67 oceniono u 182 chorych. Odsetek komórek wykazujących dodatnią reakcję jądrową z przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko antygenowi proliferacyjnemu Ki-67 (MiB-1) wahał się od 3,2 do 93,4. Średnia i mediana wynosiły odpowiednio 51,2 i 51,3. U 65 chorych (77,4%) poziom SCC-Ag po leczeniu nie przekraczał górnej granicy normy. Ze względu na małą liczebność ta grupa obejmowała zarówno chore, u których poziom markera wyjściowy i po leczeniu był w normie, jak i chore, u których po leczeniu uzyskano normalizację poziomu SCC-Ag. U 19 chorych (22,6%) poziom markera po zakończeniu leczenia pozostał podwyższony.

### **Wynik oceny zmian ilości kopii genu EGFR metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH)**

Badanie wykonano u 150 chorych. Prawidłową liczbę kopii genu *EGFR* (*disomia*) stwierdzono u 8 chorych (5,3%), niską i wysoką trisomię, niską i wysoką polisomię stwierdzono odpowiednio u 36 (24,0%), 27 (18,0%), 45 (30,0%) oraz 24 (16,0%) chorych. Amplifikację stwierdzono w 10 przypadkach (6,7%).

### **Wyniki badań cytometrycznych**

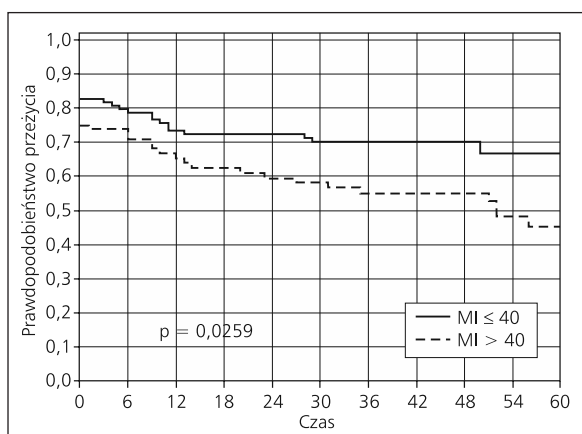
Badania wykonano u 174 chorych. U 118 chorych (67,8%) stwierdzono guzy diploidalne, u 56 (32,2%) aneuploidalne; u tych chorych, odsetek komórek aneuploidalnych wahał się od 1,0 do 91,1, średnia wynosiła 32,9, mediana 27,7.

Odsetek komórek w fazie S wynosił od 0,1 do 56,3. Średnia wynosiła 12,2, mediana 8,0. Odsetek komórek w fazie G2M wynosił od 0,1 do 20,0. Średnia wynosiła 3,5, a mediana 2,0.

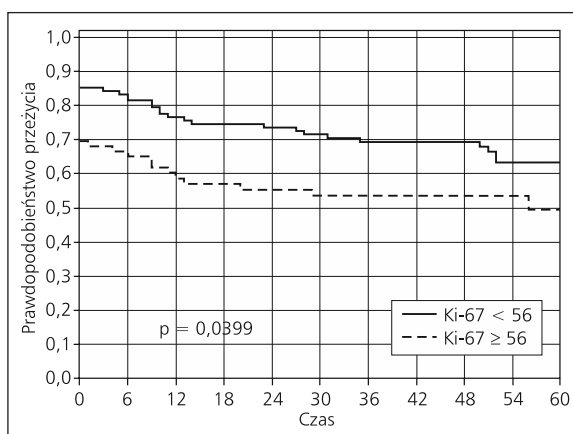
Odsetek komórek w fazach S+ G2M (indeks proliferacyjny) wynosił od 0,8 do 56,4. Średnia wynosiła 15,7; mediana 11,5.

### **Analiza przeżycia bezobjawowego**

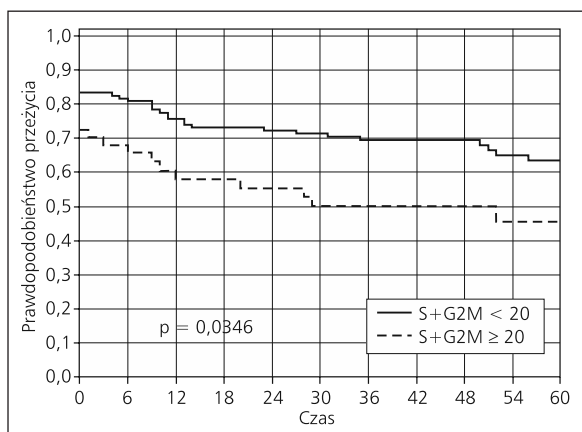
Prawdopodobieństwo przeżycia bezobjawowego 5 lat dla całej grupy wyniosło 58%. Wiek chorych i czas leczenia jako zmienne ciągle miały prognostyczny wpływ na przeżycie bezobjawowe, wartość p wyniosła odpowiednio 0,0222 i 0,0287.



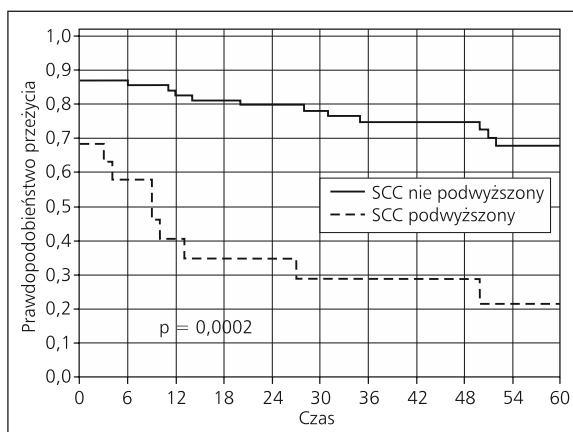
**Rycina 1.** Przeżycia bezobjawowe w grupie 186 chorych w zależności od MI



**Rycina 3.** Przeżycia bezobjawowe w grupie 186 chorych w zależności od Ki-67



**Rycina 2.** Przeżycia bezobjawowe w grupie 186 chorych w zależności od S+G2M



**Rycina 4.** Przeżycia bezobjawowe w grupie 186 chorych w zależności od poziomu SCC po leczeniu

Analiza jednocechowa potwierdziła ponadto prognostyczne znaczenie stopnia zaawansowania powyżej IIA ( $p = 0,0002$ ), poziomu Hb przed rozpoczęciem leczenia  $< 12$  g/dl ( $p = 0,0072$ ), poziomu Hb w trakcie leczenia  $< 11$  g/dl ( $p = 0,0022$ ). Pozostałe czynniki o istotnym znaczeniu prognostycznym dla przeżycia bezobjawowego to MI  $> 40$  ( $p = 0,0259$ ) (ryc. 1), obecność atypowych mitoz ( $p = 0,0349$ ), odsetek komórek aneuploidalnych  $> 20$  ( $p = 0,0347$ ), odsetek komórek w fazie S+G2M  $\geq 20$  ( $p = 0,0346$ ), (ryc. 2) oraz Ki-67  $> 56$  ( $p = 0,0399$ ), (ryc. 3). Wykazano ponadto niekorzystny wpływ braku normalizacji poziomu SCC-Ag po zakończeniu leczenia ( $p = 0,0002$ ), (ryc. 4). Dla ekspresji szeregu badanych biomarkerów: p53-1801, p53-BP, Bcl2, Bax, Cox-2, EGFR, P16, a także dla MVD nie udało się znaleźć punktu odcięcia, przekroczenie którego miałyby wpływ na przeżycia bezobjawowe. Nie wykazano również prognostycznego wpływu zmian w liczbie kopii genu EGFR ocenianych metodą FISH: disomia, niska i wysoka trisomia,

niska i wysoka polisomia i amplifikacja nie wpływały na przeżycie bezobjawowe ( $p > 0,05$ ).

### Wyniki analizy wieloczynnikowej Coxa

W tabeli II przedstawiono oceny parametrów modelu Coxa dla czynników wpływających na przeżycia bezobjawowe. Wykazano istotny prognostyczny wpływ na ryzyko „zakończenia” przeżycia bezobjawowego następujących czynników: wieku, czasu leczenia (jako zmienne o charakterze ciągłym), FIGO, MVD, ekspresji Ki-67 oraz braku normalizacji poziomu SCC po leczeniu. Najsilniejszy, negatywny wpływ miał utrzymujący się podwyższony po leczeniu poziom SCC: dla tych chorych ryzyko przerzutu, wznowy lub zgonu zwiększa się ponad 4,9 razy. Chore na raka szyjki macicy w stopniu zaawansowania powyżej IIA mają ponad dwukrotnie większe ryzyko wspomnianych niepowodzeń w porównaniu z chorymi w niższych stopniach zaawansowania. Liczba mikronaczyń przekraczająca 43 i ekspresja

**Tabela II.** Cechy statystyczne modelu Coxa wpływające na przeżycia bezobjawowe

Cecha	Wariant	Hazard względny	95% przedział	Wartość p
Wiek	(zmienna ilościowa)	0,962	0,941–0,984	0,0008
Czas leczenia w dniach	(zmienna ilościowa)	1,005	1,002–1,009	0,0055
FIGO	≤ IIA vs ≥ IIB	2,673	1,475–4,842	0,0012
CD 34	< 43 vs ≥ 43	1,887	1,087–3,276	0,0240
Ki-67	< 56 vs ≥ 56	2,119	1,282–3,509	0,0034
SCC	Niepodwyższony vs podwyższony po leczeniu	4,949	2,444–10,021	0,0000

Ki-67 powyżej 56 powodują około dwukrotnie większe ryzyko wystąpienia niepowodzenia leczenia.

## Dyskusja

### **Stopień zaawansowania, anemia, wiek i czas leczenia**

Rokownicze znaczenie zaawansowania raka szyjki macicy według klasyfikacji FIGO znane jest od dawna i nie budzi kontrowersji. Analiza grupy 186 chorych, zarówno na poziomie jedno-, jak i wieloczynnikowej potwierdziła, że stopień zaawansowania jest istotnym czynnikiem prognostycznym dla przeżycia bezobjawowego.

Poziom Hb zarówno przed leczeniem, jak i w trakcie leczenia wpływał w istotny sposób na przeżycia bezobjawowe na poziomie analizy jednocechowej. Większość autorów uznających anemię za czynnik niekorzystny rokowniczo tłumaczy to niedotlenieniem guza i związaną z tym gorszą odpowiedzią na napromienianie. Optymalny poziom Hb, zapewniający odpowiednie utlenowanie litych guzów u kobiet, to przedział między 12 a 14 g/dl.

Wiek jako zmienna ciągła miał prognostyczne znaczenie dla przeżycia bezobjawowego na poziomie analizy jedno- i wieloczynnikowej. Opinie autorów dotyczące prognostycznego znaczenia wieku chorych napromienianych są podzielone. Część autorów wskazuje na gorsze przeżycia młodych chorych, co ma wynikać z częstszego, niskiego stopnia dojrzałości histologicznej, innego niż płaskonabłonkowy typ raka i większego zaawansowania. Wartości odcinające wieku spotykane w pracach mieszczą się w szerokim przedziale od 25 do ponad 50 lat.

Czas leczenia, to obok wieku, druga zmienna ciągła, która miała zarówno na poziomie analizy jedno-, jak i wieloczechowej znaczenie prognostyczne. Wydłużający się czas napromieniania zmniejsza szansę uzyskania całkowitej regresji z uwagi na przyspieszoną repopulację komórek klonogennych guza. W piśmiennictwie zwraca się uwagę na niekorzystny wpływ, głównie na przeżycia całkowite łącznego czasu leczenia przekraczającego 7–9 tygodni.

### **Antygen SCC**

U 20–80% chorych na nieoperacyjnego raka szyjki macicy stwierdza się przed leczeniem podwyższony poziom

SCC-Ag. Według niektórych autorów wyjściowy poziom SCC jest czynnikiem prognostycznym niezależnie od metody leczenia [4–6]. Przydatność monitorowania poziomu SCC-Ag po leczeniu onkologicznym jest różnie oceniana [7–9]. Nieprawidłowy poziom SCC-Ag po radiochemioterapii może predysponować do miejscowego niepowodzenia i rozsiewu [10]. W materiale własnym podwyższony po zakończeniu leczenia onkologicznego poziom SCC był niekorzystną cechą prognostyczną zarówno na etapie analizy jedno-, jak i wieloczynnikowej. U tych chorych stwierdzono kilkakrotnie większe ryzyko nawrotu, rozsiewu i zgonu. Brak jest danych na temat celowości kontynuowania chemioterapii w tej grupie chorych.

### **Ekspresja EGFR**

W piśmiennictwie odsetek chorych na raka szyjki macicy ze stwierdzoną ekspresją EGFR waha się od kilku do 100, co związane jest ze stosowaniem różnych technik i brakiem jednolitej, powszechnie przyjętej skali oceny ekspresji EGFR. Przyjmowane punkty odcięcia dla oceny ekspresji EGFR waha się na poziomie od > 0 do 50% [11–14]. W prezentowanym materiale własnym ekspresja EGFR obecna u 164 chorych (90,1%) nie miała wpływu na przeżycia bezobjawowe chorych: nie udało się znaleźć punktu odcięcia, którego przekroczenie miało wpływ na przeżycia. W literaturze nie ma zgodnej opinii co do prognostycznego znaczenia ekspresji EGFR. W części prac, podobnie jak w materiale własnym nie wykazano związku między ekspresją EGFR a przeżyciami chorych na raka szyjki macicy [14–16]. Inni autorzy uważają, że ekspresji EGFR towarzyszą niższe przeżycia chorych na raka szyjki macicy leczonych napromienianiem z chemioterapią lub bez chemioterapii [12, 17, 18]. W pracach, w których nie wykazano wpływu ekspresji EGFR na rokowanie, przyjmowano wysokie punkty odcięcia [19]. Mechanizmy prowadzące do częstej u chorych na raka szyjki macicy ekspresji EGFR nie są do końca znane. Amplifikacja genu EGFR to jedna z dróg prowadzących do wzrostu aktywności omawianego receptora. Iida i wsp. jako jedni z pierwszych stwierdzili, że amplifikacja genu EGFR jest niezależnym, niekorzystnym czynnikiem rokowniczym u chorych na raka szyjki macicy leczonych napromienianiem [20]. W analizowanej grupie 186 chorych żadne z sześciu

kryteriów oceny liczby kopii genu EGFR z wykorzystaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (disomia, niska i wysoka trisomia, niska i wysoka polisomia i amplifikacja) nie miały wpływu na przeżycia bezobjawowe.

### **Gęstość mikropilar (MVD)**

Wieloczynnikowa analiza materiału własnego wykazała, że liczba mikronaczyń powyżej przyjętego przez nas punktu odcięcia jest czynnikiem prognostycznym dla przeżycia bezobjawowego. Według części autorów MVD powyżej przyjętego przez nich punktu odcięcia wiąże się z większym ryzykiem nawrotu u chorych na raka szyjki macicy leczonych napromienianiem z chemioterapią lub bez chemioterapii [21–23]. Według innych autorów duża gęstość mikropilar odpowiada dobrze unaczynionemu, dobrze utlenowanemu guzowi i wiąże się z lepszą odpowiedzią na napromienianie i chemioterapię [24, 25]. Szeroki zakres przyjmowanych punktów odcięcia dla MVD (od 10 do 190) oraz stosowanie przeciwciał przeciwko różnym antygenom (najczęściej CD31, CD34, CD105) może wpływać na tak różne wyniki. Analiza materiału własnego wskazuje na większe ryzyko wznowy i rozsiewu u chorych, których guz pierwotny charakteryzuje się MVD większym od 43. Brak jest danych na temat celowości kontynuowania chemioterapii w tej grupie chorych.

### **Białko P53**

Opinie o prognostycznym znaczeniu ekspresji białka P53 są podzielone. Część autorów nie wykazała prognostycznego znaczenia ekspresji białka P53 [26, 27]. Inni autorzy w analizie jednocechowej [28–30] bądź wielocechowej [31] potwierdzili niekorzystne prognostyczne znaczenie ekspresji białka P53. Oh i wsp. uznali, że ten czynnik może być pomocny w monitorowaniu chorych po leczeniu [31]. Korzystny wpływ na przeżycia niskiej ekspresji białka P53 ocenianej przed napromienianiem wykazali Oka i wsp. [32]. Analiza materiału własnego wykazała, że ekspresja epitopu BP i epitopu 1801 białka P53 nie miały wpływu na przeżycia bezobjawowe chorych.

### **Białka Bcl-2 i Bax**

Prawidłowe białko P53 reguluje geny Bax i Bcl-2, indukując lub hamując odpowiednio apoptozę. Zmutowana forma białka P53 również zachowuje zdolność oddziaływania na powyższe białka, ponadto aktywacja genów Bax i Bcl-2 może się odbywać na drodze mechanizmów niezależnych od białka P53 [33, 34]. Z dostępnej literatury wynika, że ekspresja białka Bcl-2 występuje nawet u ponad 77% chorych na raka szyjki macicy [34–36]. Najczęściej oceniano odsetek komórek wykazujących dodatnią reakcję barwną i przyjmowano punkty odcięcia od 5% do 50%. Ekspresję białka Bax przy stosowaniu różnych punktów odcięcia stwierdzano w podobnym przedziale częstotliwości [34, 35,

37]. Dostępna literatura wskazuje na brak zgodnej opinii o znaczeniu prognostycznym białek regulujących apoptozę. Część autorów wykazała pozytywny wpływ ekspresji białka Bcl-2 na przeżycia chorych na raka szyjki macicy, przy braku wpływu białka Bax [36, 37], inni — odwrotnie: wskazują na pozytywny prognostyczny wpływ ekspresji Bax i niekorzystny Bcl-2 [35]. Niektórzy autorzy wskazują na pozytywne znaczenie wzrostu ekspresji Bax po testowej dawce napromieniania i negatywne wzrostu Bcl-2 [34, 38, 39]. W materiale własnym zarówno dla ekspresji białka Bax, jak i Bcl-2 nie udało się znaleźć punktu odcięcia, przekroczenie którego miałoby wpływ na przeżycia bezobjawowe. Brak standaryzacji interpretacji wyników badań immunohistochemicznych przyczynia się do niespójnych wniosków z dotychczas przedstawionych opracowań.

### **Cox-2**

Analiza materiału własnego wykazała, że ekspresja Cox-2 nie miała wpływu na przeżycia. W dostępnej literaturze odsetek chorych na raka szyjki macicy wykazujących ekspresję Cox-2 waha się od 24 do ponad 75% [40–43]. Odsetek chorych, u których wykazano ekspresję Cox-2 w materiale własnym, należy do najwyższych, jakie można spotkać w literaturze. Wśród większości autorów oceniających prognostyczne znaczenie ekspresji Cox-2, mimo stosowania różnej klasyfikacji reakcji barwnych, panuje zgodna opinia o negatywnym wpływie ekspresji tego czynnika na przeżycia chorych na raka szyjki macicy leczonych zarówno operacyjnie, jak i napromienianiem z udziałem bądź bez udziału chemioterapii [40, 41, 44–48]. Do nielicznych należą prace, w których nie wykazano prognostycznego znaczenia ekspresji Cox-2 [49–51]. Wyniki analizy materiału własnego są zgodne z nielicznymi doniesieniami o braku prognostycznego znaczenia ekspresji Cox-2 u chorych na raka szyjki macicy.

### **P16**

Przeprowadzona analiza materiału własnego wykazała, że ekspresja białka P16, którą stwierdzono u ponad 96% chorych, nie wpływa na przeżycia bezobjawowe badanej grupy chorych. W dostępnej literaturze ekspresja białka P16, stwierdzana u 80–100% chorych na raka szyjki macicy, jest uznawana za czynnik wpływający pozytywnie na przeżycia chorych na raka szyjki macicy zarówno operowanych, jak i poddawanych radiochemioterapii [52–57]. Zwiększona ekspresja P16 ma związek z białkami E6 i E7 onkogennych wirusów HPV, które mogą wiązać i inaktywować białka supresorowe P53 i Rb. Brak ekspresji białka P16 w nielicznych przypadkach raka szyjki macicy może wynikać z jej utraty w toku progresji zmian przedinwazyjnych i w efekcie prowadzić do formy raka o bardziej agresywnym przebiegu [54]. Analiza własnego materiału — w przeciwieństwie do danych z literatury — nie wykazała prognostycznego zna-



czenia ekspresji P16. Mogła na to wpłynąć mała liczebność grupy chorych bez ekspresji białka P16: nie stwierdzono jej jedynie u 4 chorych.

### **Ki-67 i MI**

Analiza jednocechowa materiału własnego wykazała, że przekroczenie ustalonych punktów odcięcia dla indeksu Ki-67 i MI wiązało się z istotnym, niekorzystnym wpływem na przeżycie bezobjawowe. W modelu wieloczynnikowym dla przeżycia bezobjawowego istotne znaczenie miał indeks Ki-67. Ocena indeksu Ki-67 i MI jest obecnie nieczęsto przedmiotem analizy u chorych na raka szyjki macicy, w przeciwieństwie na przykład do chorych na raka piersi. Część prac z ostatnich lat nie potwierdza znaczenia prognostycznego ekspresji Ki-67 w guzie pierwotnym [58, 59], natomiast w przerzutowo zmienionych węzłach chłonnych ekspresja Ki-67 ma być istotnym czynnikiem prognostycznym dla przeżycia bezobjawowego [58]. Autorzy dwóch japońskich doniesień z połowy lat dziewięćdziesiątych wykazali, że rak szyjki macicy o wysokiej wartości Ki-67 (powyżej 33) cechuje lepszą odpowiedź na napromienianie, co może przemawiać za większą promieniowrażliwością guzów o wysokiej frakcji proliferacyjnej [60, 61]. W przeciwieństwie do cytowanych powyżej prac japońskich analiza materiału własnego wykazała, że indeks Ki-67 przekraczający punkt odcięcia to czynnik pogarszający rokowanie u chorych napromienianych z udziałem lub bez udziału cisplatin. Do podobnego wniosku doszli Garzetti i wsp., przyjmując punkt odcięcia dla Ki-67 na poziomie 50 [62]. W pracach, które nie wykazały wpływu indeksu Ki-67 na rokowanie u chorych na raka szyjki macicy, przyjmowano podobne punkty odcięcia; najczęściej były to wartości średnie, rzadziej, tak jak w materiale własnym, poszukiwanie krok po kroku optymalnych punktów odcięcia opisane w metodach statystycznych powyżej [59, 63, 64]. Niewiele pozycji piśmiennictwa dotyczy prognostycznego znaczenia MI. W dostępnej literaturze [37, 65] wysoki MI, podobnie jak w materiale własnym, uważany jest za niekorzystny czynnik prognostyczny. Analiza materiału własnego wyraźnie wskazuje na przydatność oznaczania indeksu Ki-67 w guzie pierwotnym u chorych na raka szyjki macicy przed leczeniem napromienianiem z chemioterapią lub bez chemioterapii.

### **Ploidia DNA**

Wpływ zawartości DNA w komórkach guza i frakcji komórek w fazie S na rokowanie chorych na raka szyjki macicy jest przedmiotem wielu prac. Rzadziej przedmiotem analizy jest frakcja S+G2M. Część autorów uważa, że dla chorych na raka szyjki macicy leczonych napromienianiem z chemioterapią lub bez chemioterapii lub operowanych aneuploidia i/lub wysoka frakcja S są negatywnymi czynnikami prognostycznymi [66–71]. W opinii wymienionych powyżej

autorów cytometria przepływową może być przydatna do oceny rokowania u chorych na raka szyjki macicy. Przeciwnego zdania są Pinto i wsp., Strang i wsp., a także Davis i wsp. i Gasińska i wsp. [72–75]. Również Kristensen i wsp. w grupie 465 chorych na raka szyjki macicy nie wykazała prognostycznego znaczenia charakteru ploidii i frakcji S [76]. W analizie jednocechowej własnego materiału klinicznego wykazano, że frakcja komórek w fazie S+G2M i odsetek komórek aneuploidalnych powyżej ustalonych punktów odcięcia wpływają niekorzystnie na przeżycie bezobjawowe, nie wykazano natomiast wpływu frakcji S ani charakteru ploidii. Na rozbieżną ocenę przydatności cytometrii przepływowej wpływają między innymi różnice w sposobie uzyskiwania zawiesiny komórek, następnie jąder, różnice w minimalnej ilości komórek guza przeznaczonych do analizy, uwzględnienie bądź nieuwzględnienie heterogenności guza i „szarej” strefy pomiędzy DNA diploidalnym i aneuploidalnym, a także przyjmowanie różnych punktów odcięcia dla analizowanych parametrów.

### **Wnioski**

1. Przeprowadzona analiza potwierdziła znaczenie klasycznych czynników prognostycznych: zaawansowania raka szyjki macicy według klasyfikacji FIGO i czasu leczenia.
2. Przedterapeutyczne informacje o MVD i ekspresji Ki-67 w guzie pierwotnym, a także o poziomie SCC-Ag po zakończeniu leczenia onkologicznego są pomocne w ocenie ryzyka wystąpienia niepowodzenia leczenia napromienianiem z cisplatiną lub bez cisplatin.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

### **Dr hab. n. med. Małgorzata Klimek**

*Klinika Ginekologii Onkologicznej  
Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie  
Oddział w Krakowie  
ul. Garncarska 11, 31–115 Kraków  
e-mail: klimekmag@poczta.onet.pl*

*Otrzymano i przyjęto do druku: 24 listopada 2014 r.*

### **Piśmiennictwo**

1. Remmele W, Stenger HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) fuer den immunohistochemischen Oestrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammarkarzinomgewebe. *Der Pathologe* 1987; 8: 138–140.
2. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW i wsp. Methodology for analysis cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333–1335.
3. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B i wsp. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. International Society for Analytical Cytology. *Cytometry* 1993; 14: 472–477.
4. Strauss HG, Laban C, Lautenschläger C i wsp. SCC antigen in the serum as an independent prognostic factor in operable squamous cell carcinoma of the cervix. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1987–1991.
5. Ferrandina G, Macchia G, Legge F i wsp. Squamous cell carcinoma antigen in patients with locally advanced cervical carcinoma undergoing preoperative radiochemotherapy: association with pathological response to treatment and clinical outcome. *Oncology* 2008; 74: 42–49.

6. Ogino I, Nakayama H, Okamoto N i wsp. The role of pretreatment squamous cell carcinoma antigen level in locally advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by radiotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1094–1100.
7. Chan YM, Ng TY, Ngan HY i wsp. Monitoring of serum squamous cell carcinoma antigen levels in invasive cervical cancer: is it cost-effective? *Gynecol Oncol* 2002; 84: 7–11.
8. Yoon SM, Shin KH, Kim JY i wsp. Use of serum squamous cell carcinoma antigen for follow-up monitoring of cervical cancer patients who were treated by concurrent chemoradiotherapy. *Radiat Oncol* 2010; 5: 78.
9. Micke O, Bruns F, Schäfer U i wsp. The impact of squamous cell carcinoma (SCC) antigen in patients with advanced cancer of uterine cervix treated with (chemo)radiotherapy. *Anticancer Res* 2005; 25: 1663–1666.
10. Hirakawa M, Nagai Y, Inamine M i wsp. Predictive factor of distant recurrence in locally advanced squamous cell carcinoma of the cervix treated with concurrent chemoradiotherapy. *Gynecol Oncol* 2008; 108: 126–129.
11. Pérez-Regadera J, Sánchez-Muñoz A, De-la-Cruz J i wsp. Impact of epidermal growth factor receptor expression on disease-free survival and rate of pelvic relapse in patients with advanced cancer of the cervix treated with chemoradiotherapy. *Am J Clin Oncol* 2011; 34: 395–400.
12. Cho NH, Kim YB, Park TK i wsp. P63 and EGFR as prognostic predictors in stage IIb radiation-treated cervical squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol* 2003; 91: 346–353.
13. Kedzia W, Schmidt M, Frankowski A i wsp. Immunohistochemical assay of p53, cyclin D1, c-erbB2, EGFR and Ki-67 proteins in HPV-positive and HPV-negative cervical cancers. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40: 37–41.
14. Lindstrom AK, Tot T, Stendahl U i wsp. Discrepancies in expression and prognostic value of tumor markers in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in cervical cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 2577–2578.
15. Yamashita H, Murakami N, Asari T i wsp. Correlation among six biologic factors (p53, p21(WAF1), MIB-1, EGFR, HER2, and Bcl-2) and clinical outcomes after curative chemoradiation therapy in squamous cell cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74: 1165–1172.
16. Baltazar F, Filho AL, Pinheiro C i wsp. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor expressions in different histological subtypes of cervical carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26: 235–241.
17. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A i wsp. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 922–928.
18. Noordhuis MG, Eijnsink JJ, Ten Hoor KA i wsp. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo)radiation and survival in cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7389–7397.
19. Soonthornthum T, Arias-Pulido H, Joste N i wsp. Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer. *Ann Oncol* 2011; 22: 2166–2178.
20. Iida K, Nakayama K, Rahman MT i wsp. EGFR gene amplification is related to adverse clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma, making the EGFR pathway a novel therapeutic target. *Br J Cancer* 2011; 105: 420–427.
21. Lenczewski A, Terlikowski SJ, Sulkowska M i wsp. Prognostic significance of CD34 expression in early cervical squamous cell carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40: 205–206.
22. Vieira SC, Silva BB, Pinto GA i wsp. CD34 as a marker for evaluating angiogenesis in cervical cancer. *Pathol Res Pract* 2005; 201: 313–318.
23. Cantu De León D, Lopez-Graniel C, Frias Mendivil M i wsp. Significance of microvascular density (MVD) in cervical cancer recurrence. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13: 856–862.
24. Gasinska A, Urbanski K, Adamczyk A i wsp. Prognostic significance of intratumour microvessel density and haemoglobin level in carcinoma of the uterine cervix. *Acta Oncol* 2002; 41: 437–443.
25. Liao SY, Darcy KM, Randall LM i wsp. Prognostic relevance of carbonic anhydrase-IX in high-risk, early-stage cervical cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 2010; 116: 452–458.
26. Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E i wsp. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 129–136.
27. Brenna SM, Zefferino LC, Pinto i wsp. P53 expression as a predictor of recurrence in cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12: 299–303.
28. Jain D, Srinivasan R, Patel FD i wsp. Evaluation of p53 and Bcl-2 expression as prognostic markers in invasive cervical carcinoma stage IIb/III patients treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol* 2003; 88: 22–28.
29. Moon A, Won KY, Lee JY i wsp. Expression of BDNF, TrkB, and p53 in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathology* 2011; 43: 453–458.
30. Huang LW, Chou YY, Chao SL i wsp. P53 and p21 expression in precancerous lesions and carcinomas of the uterine cervix: overexpression of p53 predicts poor disease outcome. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 348–354.
31. Oh MJ, Choi JH, Lee YH i wsp. Mutant p53 protein in the serum of patients with cervical carcinoma: correlation with the level of serum epidermal growth factor receptor and prognostic significance. *Cancer Lett* 2004; 203: 107–112.
32. Oka K, Suzuki Y, Nakano T. Expression of p27 and p53 in cervical squamous cell carcinoma patients treated with radiotherapy alone: radiotherapeutic effect and prognosis. *Cancer* 2000; 88: 2766–2773.
33. Lu QL, Abel P, Foster CS i wsp. Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 1996; 27: 102–110.
34. Tanaka Y, Harima Y. Oncoprotein expression predicts response to radiotherapy or thermoradiotherapy in human cervical cancer. *Experimental Oncology* 2000; 22: 52–58.
35. Wootipoom V, Lekhyanda N, Phunggrassami T i wsp. Prognostic significance of Bax, Bcl-2, and p53 expression in cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol* 2004; 94: 636–642.
36. Craford RA, Caldwell C, Iles RK i wsp. Prognostic significance of the bcl-2 apoptotic family of proteins in primary and recurrent cervical cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 210–214.
37. Tjalma WA, Weyler JJ, Bogers JJ i wsp. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001; 97: 223–230.
38. Yuki H, Fujimura M, Yamakawa Y i wsp. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-associated proteins as early predictors of prognosis after irradiation therapy in stage IIIb uterine cervical cancer. *Jpn J Cancer Res.* 2000; 91: 127–134.
39. Adhya AK, Srinivasan R, Patel FD. Radiation therapy induced changes in apoptosis and its major regulatory proteins, Bcl-2, Bcl-XL, and Bax, in locally advanced invasive squamous cell carcinoma of the cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2006; 25: 281–287.
40. Kim YB, Kim GE, Cho NH i wsp. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer* 2002; 95: 531–539.
41. Gaffney DK, Holden JA, Davis M i wsp. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49: 1213–1217.
42. Noh JM, Park W, Seuh SJ i wsp. Correlation between tumor volume response to radiotherapy and expression of biological markers in patients with cervical cell carcinoma. *J Gynecol Oncol* 2009; 20: 215–220.
43. Kang MK, Park W, Choi YL i wsp. The effect of cyclooxygenase-2 expression on tumor volume response in patients with radiotherapy for uterine cervical cancer. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 1170–1176.
44. Ryu HS, Chang KH, Yang HW i wsp. High cyclooxygenase-2 expression in stage IB cervical cancer with lymph node metastasis or parametrial invasion. *Gynecol Oncol* 2000; 76: 320–325.
45. Ferrandina G, Lauriola L, Zannoni GF i wsp. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in tumour and stroma compartments in cervical cancer: clinical implications *Br J Cancer* 2002; 87: 1145–1152.
46. Chen HH, Su WC, Chou CY i wsp. Increased expression of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 is associated with poor survival in cervical cancer treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63: 1093–1100.
47. Noriyuki M, Sumi T, Zhi X i wsp. Vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases, and cyclooxygenase-2 influence prognosis of uterine cervical cancer in young women. *Int J Oncology* 2007; 31: 531–536.
48. Huang M, Chen Q, Xiao J i wsp. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2013; 132: 263–273.
49. Giordano G, D'Adda T, Dal Bello B i wsp. Clinicopathologic implications of the epidermal growth factor receptor, cyclooxygenase 2 expression, and human papillomavirus status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the elderly. *Int J Gynecol Cancer* 2011; 21: 337–348.
50. Athawale R, Clooney K, O'Hagan J i wsp. COX-1 and COX-2 expression in stage I and II invasive cervical carcinoma: relationship to disease relapse and long-term survival. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1303–1308.
51. Manchana T, Triratanachai S, Sirisabya N i wsp. Prevalence and prognostic significance of COX-2 expression in stage IB cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2006; 100: 556–560.
52. Van de Putte G, Holm R, Lie AK i wsp. Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 140–147.

53. Schwarz JK, Lewis JS Jr, Pfeifer J i wsp. Prognostic significance of p16 expression in advanced cervical cancer treated with definitive radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; 84: 153–157.
54. Masoudi H, Van Niekerk DJ, Gilks CB i wsp. Loss of p16 INK4 expression in invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix is an adverse prognostic markers. *Histopathology* 2006; 49: 542–545.
55. Gupta R, Srinivasan R, Nijhawan R i wsp. Protein p16 INK4 expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 2010; 53: 7–11.
56. Queiroz C, Silva TC, Alves VA i wsp. P16 (INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract* 2006; 202: 77–83.
57. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S i wsp. Ki-67, cyclin E and p16 INK4 are complementary surrogate biomarkers for human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 884–891.
58. Graflund M, Sorbe B, Karlsson M. MIB-1, p53, bcl-2, and WAF-1 expression in pelvic lymph nodes and primary tumors in early stage cervical carcinomas: correlation with clinical outcome. *Int J Oncol* 2002; 20: 1041–1047.
59. Shiohara S, Shiozawa T, Miyamoto T i wsp. Expression of cyclins, p53, and Ki-67 in cervical squamous cell carcinomas: overexpression of cyclin A is a poor prognostic factor in stage Ib and II disease. *Virchows Arch* 2005; 446: 626–633.
60. Nakano T, Oka K. Differential values of Ki-67 index and mitotic index of proliferating cell population: an assessment of cell cycle and prognosis in radiation therapy for cervical cancer. *Cancer* 1993; 72: 2401–2408.
61. Oka K, Nakano T, Hoshi T. Transient increases of growth fraction during fractionated radiation therapy for cervical carcinoma. Ki-67 and PC 10 immunostaining. *Cancer* 1993; 72: 2621–2627.
62. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G i wsp. MIB-1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: relationship with natural killer cell activity. *Gynecol Oncol* 1995; 58: 28–33.
63. Cole DJ, Brown DC, Crossley E i wsp. Carcinoma of the cervix uteri: an assessment of the relationship of tumour proliferation to prognosis. *Br J Cancer* 1992; 65: 783–785.
64. Oka K, Arai T. MIB1 growth fraction is not related to prognosis in cervical squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Int J Gynecol Pathol.* 1996; 15: 23–27.
65. Suzuki Y, Oka K, Ohno T i wsp. Prognostic impact of mitotic index of proliferating cell populations in cervical cancer patients treated with carbon ion beam. *Cancer* 2009; 115: 1875–1882.
66. Susini T, Olivieri S, Molino C i wsp. DNA ploidy is stronger than lymph node metastasis as prognostic factor in cervical carcinoma: 10-year results of a prospective study. *Int J Gynecol Oncol* 2011; 21: 678–684.
67. Grote HJ, Friedrichs N, Pomjanski N i wsp. Prognostic significance of DNA cytometry in carcinoma of the uterine cervix FIGO stage IB and II. *Anal Cell Pathol* 2001; 23: 97–105.
68. Wimberger P, Hillemanns P, Kapsner T i wsp. Evaluation of prognostic factors following flow-cytometric DNA analysis after cytokeratin labelling: II. Cervical and endometrial cancer. *Anal Cell Pathol* 2002; 24: 147–158.
69. Reich O, Pürstner P, Klaritsch P i wsp. Prognostic significance of preoperative DNA flow cytometry in surgically-treated cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2003; 24: 13–17.
70. Wilailak S, Rochanawutanon M, Srisupundit S i wsp. Flow cytometric analysis of DNA ploidy and S-phase fraction of Stage IIIB cervical carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25: 428–430.
71. Anton M, Nenutil R, Rejhar A i wsp. DNA flow cytometry : a predictor of a high-risk group in cervical cancer. *Cancer Detect Prev* 1997; 21: 242–246.
72. Pinto A, Pires A, Silva G i wsp. Ploidy and S-phase fraction as predictive markers of response to radiotherapy in cervical cancer. *Pathol Res Pract* 2011; 207: 623–627.
73. Strang P, Stendahl U, Bergstrom R i wsp. Prognostic flow cytometric information in cervical squamous cell carcinoma: a multivariate analysis of 307 patients. *Gynecol Oncol* 1991; 43: 3–8.
74. Davis JR, Aristizabal S, Way DL i wsp. DNA ploidy, grade and stage in prognosis of uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1989; 32: 4–7.
75. Gasińska A, Urbański K, Jakubowicz J i wsp. Tumour cell kinetics as a prognostic factor in squamous cell carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Radiother Oncol* 1999; 50: 77–84.
76. Kristensen GB, Kaern J, Abeler VM i wsp. No prognostic impact of flow-cytometric measured DNA ploidy and S-phase fraction in cancer of the uterine cervix: a prospective study of 465 patients. *Gynecol Oncol* 1995; 57: 79–85.