Prognostický význam exprese proteinu p53 u pacientů léčených pooperační adjuvantní radioterapií pro adenokarcinom rekta

David Buka¹, Josef Dvořák², Veronika Sitorová³, Igor Richter⁴, Igor Sirák¹, Radek Zapletal²,
Zuzana Donátová², Jana Hatlová³, René Vobořil⁵

¹Klinika onkologie a radioterapie LF UK a FN Hradec Králové

²Onkologická klinika, 1. LF UK a Thomayerova nemocnice, Praha

³Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN Hradec Králové

⁴Oddělení klinické onkologie, Krajská nemocnice Liberec, a.s.

⁵Chirurgická klinika 1. LF UK a Nemocnice Na Bulovce, Praha

Východiska a cíl: Tumor supresorový gen *TP53* je jedním z nejčastěji mutovaných genů lidských nádorů. Cílem této studie bylo zhodnotit prognostický význam exprese produktu tohoto genu-proteinu p53 u pacientů léčených pooperační adjuvantní radioterapií pro lokálně pokročilý adenokarcinom rekta.

Pacienti a metody: Do studie bylo zařazeno 59 pacientů s lokálně pokročilým adenokarcinomem rekta, léčených pooperační adjuvantní radioterapií.

Výsledky: Medián exprese proteinu p53 činil 70 %. Pětileté celkové přežití (OS) podle mediánu exprese proteinu p53: p53 < 70 = 53 %, pětileté celkové přežití p53 > 70 = 57 %, logrank: p = 0,86; HR = 0,94. Pětileté přežití bez progresu (PFS) podle mediánu exprese proteinu p53: p53 < 70 = 47 %, pětileté přežití bez progresu p53 > 70 = 49 %, logrank: p = 0,92; HR = 0,97.

Závěr: Tato studie zmapovala expresi proteinu p53 u pacientů s lokálně pokročilým adenokarcinomem rekta. V hodnoceném souboru nebyl prokázán prediktivní ani prognostický význam exprese proteinu p53, což může být způsobeno širokým spektrem faktorů, které expresi proteinu p53 ovlivňují.

Klíčová slova: karcinom rekta, radioterapie, protein p53.

Prognostic significance of expression of protein p53 in rectal cancer patients treated with postoperative adjuvant radiotherapy

Background: Tumor suppressor gene *TP53* is one of the most frequently mutated genes in human tumors. The aim of the study was to assess the prognostic significance of the expression of the product of this gene-protein p53 in patients treated with postoperative adjuvant radiotherapy for locally advanced rectal adenocarcinoma.

Patients and methods: In total 59 patients with locally advanced rectal cancer were studied retrospectively. Results: The median expression of protein p53 was 70%. Five-year overall survival according to the median expression of protein p53: p53 < 70 = 53%, five-year overall survival of p53 > 70 = 57%, logrank: p = 0,86; HR = 0,94. Five-year progression free survival (PFS) according to the median expression of protein p53: p53 < 70 = 47%, five-year progression free survival of p53 > 70 = 49%, logrank: p = 0,92; HR = 0,97.

Conclusion: The results of this study demonstrate protein p53 expression in locally advanced rectal adenocarcinoma. This study did not show predictive or prognostic significance of expression of protein p53, which can be caused by a wide range of factors which influence the expression of protein p53.

Key words: rectal cancer, radiotherapy, angiogenesis, protein p53.

Úvod

Incidence a prevalence karcinomu rekta v České republice trvale stoupá (1). Intenzivně jsou hledány možnosti, jak více individualizovat jeho léčbu pomocí biomarkerů.

Produkt tumor supresorového genu **TP53** (lokus 17p13.1) transkripční faktor p53 je klíčový a nezastupitelný mediátor a částečně i efektor indukce apoptózy v odpovědi na signály genotoxického stresu (poškození DNA) a onkogenní signalizace (aberrantní mitogenní stimuly) (2). Funkční poškození či deregulace hladin proteinu p53 poskytuje nádorové buňce důležitou výhodu, díky které není schopna podstoupit apoptózu v důsledku poškození DNA. Místo toho tyto patologické změny fixuje a dále přenáší do dalších generací (3).

Časté jsou také mutace v genech signali-začně nadřazených proteinu p53, jako jsou např. **ATM (ataxia teleangiectasia mutated)** nebo **CHK2 (checkpoint kináza 2)**. U nádorů s nemutovanou variantou p53 jsou časté mutace nebo jiná poškození na úrovni jeho hlavního regulátoru proteinu **MDM2 (mouse double minute 2)** (3), který funguje jako ubiquitin E3 ligáza, připojuje tedy na p53 ubiquitin, což jej označuje pro degradaci na proteasomu. Kromě toho se p53 po vazbě na MDM2 přesouvá z jádra do cytoplazmy, což dále blokuje jeho aktivitu.

V preklinické studii byly myši thymocyty s mutovaným genem **TP53** radiorezistentní k dávce ionizujícího záření 5 Gy, zatímco s **wild type** genem **TP53** byly výrazně radiosenzitivní ke stejné dávce záření (4). Tyto výsledky byly potvrzeny v modelech kolorektálního karcinomu **in vitro** a **in vivo** (5, 6, 7).

Až polovina solidních nádorů vykazuje strukturální defekty p53. Mutace genu **TP53** často vede k patologické stabilizaci defektního proteinu p53, a laboratorně detekované zvýšení exprese p53 v nádorových buňkách tak není odrazem zvýšené aktivity p53, ale naopak znakem přítomnosti mutované (nefunkční) alely p53 (2). Díky retrospektivnímu charakteru studie jsme u našich pacientů již znali průběh jejich onkologického onemocnění včetně výsledné prognózy. Předpokládali jsme kratší celkové přežití u pacientů s vyšší expresí proteinu p53.

Cílem této studie bylo určit expresi proteinu p53 u pacientů léčených pooperační adjuvantní radioterapií pro lokálně pokročilý adenokarcinom rekta a zhodnotit její prognostický význam.

Tab. 1. Exprese proteinu p53 v %

Procenta	0 %	1–25 %	26–50 %	51–75 %	76–100 %
Počet pacientů	21	4	2	4	28

Pacienti a metody

Do studie bylo zařazeno 59 pacientů (36 mužů a 23 žen) s lokálně pokročilým adenokarcinomem rekta, kteří byli léčeni na Klinice onkologie a radioterapie FN Hradec Králové od července 1995 do března 2004. Medián věku činil 64 (36–80) let. Patologická TNM klasifikace před pooperační radiochemoterapií: II. stadium 37 pacientů a III. stadium 22 pacientů.

Pooperační radioterapie byla aplikována na oblast malé pánve ze 4 polí box technikou, lineárním urychlovačem, ložiskovou dávkou 45 Gy/ 25 frakcí/ 5x týdně, u 18 pacientů s následným boostem 5,4 Gy/ 3 frakce zmenšenými polí. U 19 pacientů byla aplikována samostatná radioterapie a u 40 pacientů byla radioterapie potencována 5-fluorouracilem v dávce 200 mg/m²/den kontinuálně, po dobu radioterapie, s víkendovými přerušeními. Dva pacienti nedokončili plánovanou dávku radioterapie z důvodu gastrointestinální toxicity. Tři pacienti nedokončili plánovanou potenciaci 5-fluorouracilem, z důvodu hematologické toxicity (8, 9).

Radikální R0 resekce nádoru byla provedena u 55 pacientů: radikální resekce nádoru se zachováním anu u 35 pacientů a abdominoperianální amputace rekta u 20 pacientů. Radikální resekce se zachováním anu s mikroskopicky pozitivními okraji byla provedena u 4 pacientů.

Histologická vyšetření chirurgického resekátu byla prováděna ve Fingerlandově ústavu patologie FN v Hradci Králové. Materiál byl rutinně fixován v 10% formalínu, zpracován běžnou parafínovou technikou a barven hematoxylinem-eosinem. Stanoven byl histologický typ nádoru a stupeň jeho diferenciaci. Grading v resekátu byl u 5 pacientů dobře diferencovaný, 32 pacientů středně a 22 pacientů málo diferencovaný. V archivních parafínových blocích byla imunohistochemicky vyšetřena exprese proteinu p53 (obrázek 1). Ve světelném mikroskopu byla hodnocena pozitivita reakce. Exprese proteinu p53 byla hodnocena semikvantitativně. K imunohistochemickému vyšetření byla použita nepřímá imunohistochemická metoda s použitím avidin-biotinového vizualizačního systému LSAB+. Statistické hodnocení bylo provedeno v programu NCSS 9.

Obr. 1. Imunohistochemická pozitivita proteinu p53, zvětšeno 200x

Obr. 2. Pětileté celkové přežití (OS) podle mediánu exprese proteinu p53; medián exprese proteinu p53 činil 70 %; pacienti s expresí proteinu p53 méně než 70 % červená křivka; pacienti s expresí proteinu p53 více než 70 % modrá křivka

Obr. 3. Pětileté přežití bez progresu (PFS) podle mediánu exprese proteinu p53. Medián exprese proteinu p53 činil 70 %; pacienti s expresí proteinu p53 méně než 70 % červená křivka; pacienti s expresí proteinu p53 více než 70 % modrá křivka

Výsledky

Medián doby sledování souboru byl 75 měsíců (tj. 6,3 roku) od ukončení léčby. U 34 pacientů došlo v průběhu poléčebného sledování k recidivě onemocnění, 38 pacientů v době sledování zemřelo. V době hodnocení souboru žilo 17 pacientů bez známek onemocnění a 3 pacienti s recidivou onemocnění. Pětileté celkové přežití (OS) souboru činilo 51 % (95%

CI: 38–64 %). Pětileté přežití bez příznaků onemocnění (DFS) celého souboru činilo 47 % (95% CI: 34–60 %).

U 38 pacientů byla exprese pozitivní, u 21 negativní. Medián exprese proteinu p53 činil 70 % (tabulka 1). Pětileté celkové přežití (OS) podle mediánu exprese proteinu p53: p53 < 70 = 53 % (95% CI = 35–71 %), pětileté celkové přežití p53 > 70 = 57 % (95% CI = 39–76 %), logrank: $p = 0,86$; HR = 0,94 (95% CI = 0,49–1,83) (obrázek 2). Pětileté přežití bez progresu (PFS) podle mediánu exprese proteinu p53: p53 < 70 = 47 % (95% CI = 28%–67%), pětileté přežití bez progresu p53 > 70 = 49 % (95% CI = 30–68 %), logrank: $p = 0,92$; HR = 0,97 (95% CI = 0,48–1,95) (obrázek 3).

Diskuze

Gen **TP53** je jedním z nejčastěji mutovaných genů lidských nádorů. Protein p53 proto patří mezi nejvíce studované biomarkery solidních nádorů (10). Výsledky studií, které hodnotily jeho prediktivní a prognostický význam u ade-

nokarcinomu rekta jsou však v řadě případů protichůdné (11).

Dle metaanalýzy 25 klinických studií ze 17 zemí světa na 3 853 pacientech s kolorektálním karcinomem, se mutace genu **TP53** vyskytovala častěji v distální části tlustého střeva a rekta (u 45 % pacientů) než v proximální části tlustého střeva (u 34 % pacientů) (12).

Dle metaanalýzy 168 klinických studií na 18 766 pacientech s kolorektálním karcinomem, je abnormální exprese proteinu p53 a/nebo mutace genu **TP53** spojena s vyšším relativním rizikem úmrtí: 1,31 při imunohistochemickém stanovení exprese proteinu p53 a 1,32 při mutační analýze genu **TP53**. Při abnormálním p53 u karcinomu rekta je zvýšené relativní riziko selhání léčebné odpovědi na radioterapii 1,49 (13).

Dle metaanalýzy 30 klinických studií na 1 830 pacientech **wild type** forma p53 (nízká exprese proteinu p53 a/nebo **wild type** stav genu **TP53**) je prediktivním faktorem léčebné odpovědi na neoadjuvantní radioterapii lokálně

pokročilého adenokarcinomu rekta (14). V naší studii jsme hodnotili význam exprese p53 u pacientů léčených adjuvantní radioterapií.

Získané hodnoty exprese proteinu p53 u pacientů s lokálně pokročilým adenokarcinomem rekta v naší studii byly ve shodném číselném rozmezí s literárními údaji z již publikovaných studií, nepodařilo se nám však prokázat statistickou závislost mezi expresí proteinu p53 v nádoru a prognózou.

Závěr

Tato studie zmapovala expresi proteinu p53 pacientů s lokálně pokročilým adenokarcinomem rekta. V hodnoceném souboru nebyl prokázán prediktivní ani prognostický význam exprese proteinu p53 u pacientů léčených pooperační adjuvantní radioterapií pro lokálně pokročilý adenokarcinom rekta, což může být způsobeno širokým spektrem faktorů, které expresi proteinu p53 ovlivňují.

Poděkování: Práce byla podpořena projektem PRVOUK P37/01 a PRVOUK P37/11.

LITERATURA

1. Dušek L, Pavlík T, Májek O, et al. Odhady incidence, prevalence a počtu onkologických pacientů léčených protinádorovou terapií v letech 2015 a 2020 – analýza Národního onkologického registru ČR. *Klinická onkologie*. 2015; 28: 30–43.
2. Klener P jr, Klener P. *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha: Grada Publishing 2013: 200 s.
3. Slabý O, et al. *Molekulární medicína*. Praha: Galén 2015: 598 s.
4. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847–849.
5. Huerta S, Gao X, Saha D. Mechanisms of resistance to ionizing radiation in rectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2009; 9: 469–480.
6. Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, et al. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res* 1994; 54: 614–617.
7. Spitz FR, Nguyen D, Skibber JM, Meyn RE, Cristiano RJ, Roth JA. Adenoviral-mediated wild-type p53 gene expression sensitizes colorectal cancer cells to ionizing radiation. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1665–1671.
8. Dvořák J, Sitorová V, Richter I, et al. Prognostický význam survivinu u pacientů s lokálně pokročilým adenokarcinomem rekta léčených pooperační adjuvantní radioterapií. *Onkologie* 2016; (10)3: 131–134.
9. Dvořák J, Sitorová V, Richter I, et al. Prognostický význam hustoty kapilár určené pomocí protilátky proti CD34 a CD105 u pacientů léčených pooperační adjuvantní radioterapií pro adenokarcinom rekta. *Onkologie* 2016; (10)4: 189–192.
10. Zeestraten EC, Benard A, Reimers MS, et al. The prognostic value of the apoptosis pathway in colorectal cancer: a review of the literature on biomarkers identified by immunohistochemistry. *Biomark Cancer* 2013; 5: 13–29.
11. Huh JW, Lee WY, Kim SH, et al. Immunohistochemical detection of p53 expression in patients with preoperative chemoradiation for rectal cancer: association with prognosis. *Yonsei Med J* 2015; 56: 82–88.
12. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, et al. The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7518–7528.
13. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer* 2005; 92: 434–444.
14. Chen MB, Wu XY, Yu R, et al. P53 status as a predictive biomarker for patients receiving neoadjuvant radiation-based treatment: a meta-analysis in rectal cancer. *PLoS One* 2012; 7: e45388. doi: 10.1371/journal.pone.0045388.