

STRESZCZENIE

Wprowadzenie

Raki głowy i szyi to grupa nowotworów ze stosunkowo wysokim wskaźnikiem zachorowalności i umieralnością. Stanowią one znaczący problem zdrowotny ze względu na swoją lokalizację, która jest trudno dostępna dla leczenia chirurgicznego i ze względu na agresywny przebieg choroby. Adjuwantowe leczenie, takie jak radioterapię (RT), albo chemioradioterapię (CRT) pooperacyjną stosuje się w rakach głowy i szyi w zaawansowanym stadium choroby lub w przypadku kliniczno-patologicznych czynników złego rokowania. Jednakże te metody leczenia nie są wolne od powikłań. Dlatego tak ważna jest stratyfikacja ryzyka, by do tego typu leczenia zakwalifikować pacjentów, którzy najbardziej go potrzebują. Potrzebne są nowe czynniki kliniczno-patologiczne, które wspomogą proces podejmowania decyzji co do rodzaju leczenia. Stosunek ilościowy komórek i podścieliska (tumor-stroma ratio: TSR) to nowy czynnik, który niedawno został potwierdzony jako prognostyczny w różnych typach nowotworów. Koreluje on z dłuższym czasem przeżycia wolnym od choroby (DFS) i czasem przeżycia całkowitego (OS) dla guzów, których ilość podścieliska jest mniejsza w stosunku do komórek właściwych guza (nowotwory ubogie w podścielisko - SLT vs. nowotwory bogate w podścielisko - SHT), z punktem odcięcia ustalonym na poziomie 50% podścieliska. W nowotworach głowy i szyi TSR było przedmiotem nielicznych badań.

Założenia i Cele

Założenia i cele projektu były następujące: 1) przeanalizować TSR i jego prognostyczną wartość u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi (HNSCC), którzy przeszli zabieg operacyjny pierwotnego guza i adjuwantową RT lub CRT z intencją leczniczą, 2) ustalić punkt odcięcia dla TSR, który najlepiej oddzieli pacjentów z SHT od tych z SLT pod względem prognostycznym, biorąc pod uwagę DFS i OS, 3) zbadać leukocyty naciekające guz (TILs) i znaleźć korelacje między TSR a reakcją układu immunologicznego.

Metodologia

Badanie polegało na retrospektywnej analizie danych klinicznych i patologicznych pacjentów z HNSCC, których bloczki parafinowe z wycinków operacyjnych były dostępne na oddziale Patologii Nowotworów w Wielkopolskim Centrum Onkologii w Poznaniu. Ze szpitalnej bazy danych zostali wybrani pacjenci z HNSCC spełniający następujące kryteria: stadium pT1-T4, pN0-N3, M0, którzy przeszli zabieg operacyjny pierwotnego guza i adjuwantową RT lub CRT z intencją leczniczą w latach od 2011 do 2016. W sumie do projektu wybrano 91 biopsji od pacjentów z rakiem: gardła, krtani, warg i jamy ustnej. Kliniczne dane z początku leczenia jak i z okresu obserwacji uzyskano z systemu informatycznego szpitala. Parametry patomorfologiczne wyszukano w rozpoznaniach lub odczytano z biopsji. TSR zostało ocenione w sposób półilościowy na wycinku barwionym hematoksyliną-eozyną (HE) odpowiadającym punktowi najgłębszego naciekania, w polu widzenia posiadającym najwięcej podścieliska pod 10-krotnym powiększeniem obiektywu. Ten parametr został wyrażony jako procent komponentu podścieliska raka w ocenianym polu. TILs zdefiniowano jako naciek komórek zapalnych jednojądrowych w tkance guza, z wyłączeniem nacieku wielojądrowego. Dla każdego wycinku dokonano oceny półilościowej w obszarze reprezentującym naciek nowotworu. TILs naciekające podścielisko (sTILs) i komórki właściwe guza (iTILs) zostały osobno ocenione i wyrażone jako procent podścieliska lub tkanki właściwej guza, które zajmują. Wynik reprezentował naciek TILs uśredniony z całego wycinku ocenionego pod małym powiększeniem, a w razie potrzeby, celem uściślenia, pod 20-krotnym powiększeniem obiektywu. Następujące barwienia immunohistochemiczne (IHC) zostały ocenione pod względem gęstości nacieku: CD3 (limfocyty T), CD4 (Th)(limfocyty T pomocnicze), CD8 (limfocyty T cytotoksyczne), CD20 (limfocyty B), CD68 i CD163 (makrofagi związane z nowotworem odpowiednio typu M1 i M2). Do oceny każdego barwienia wybrano losowo trzy pola widzenia pod 40-krotnym powiększeniem obiektywu. Trzy wyniki zostały wygenerowane odpowiednio dla leukocytów naciekających podścielisko i dla tych obecnych w tkance właściwej guza. Do oceny nacieku wyżej wymienionych populacji leukocytów posłużono się skalą półilościową, z wartościami oscylującymi

miedzy 0 (naciek leukocytarny nieobecny w ocenianym polu) a 3 (obfity naciek leukocytarny w ocenianym polu). Następnie policzono średni wynik dla każdego barwienia i przedziału (podścielisko lub tkanka właściwa guza) i średni ogólny wynik z obu przedziałów np. sCD3, iCD3, średni CD3.

Wyniki:

Przeprowadzono analizę opisową danych klinikopatologicznych. Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera dla SHT i SLT rozchodziły się dla OS około 19 miesięcy po operacji, a dla DFS około 17 miesięcy. Tendencje do dłuższych przeżyć wykazywali pacjenci z SLT ($P > 0,05$). Punkt odcięcia na poziomie 40%, to znaczy SHT o ilości $>40\%$ podścieliska i SLT o ilości $\leq 40\%$ podścieliska, wydawał się bardziej adekwatnie dzielić nowotwory na SHT i SLT pod względem prognostycznym dla OS i DFS niż punkt odcięcia 50%, mimo iż nie osiągnięto istotności statystycznej ($P > 0,05$). Znalezione statystycznie istotną różnicę pomiędzy gęstością nacieku sTILs w SHT i SLT ($P = 0,04$). Zaobserwowano więcej sTILs w SLT (mediana: 40%; dolny kwartył: 20%; górny kwartył: 60%) niż w SHT (mediana: 30%; dolny kwartył: 20%; górny kwartył: 40%). Znalezione statystycznie istotną różnicę pomiędzy SHT i SLT jeśli chodzi o sCD20 ($P = 0,007$) i średnie wartości CD20 ($P = 0,009$). Ponadto znalezione odwrotną korelację między sCD20 a TSR i między średnim CD20 i TSR: im więcej podścieliska w guzie, tym mniejszy naciek sCD20 i średni naciek CD20. Zaobserwowano zdecydowanie niższe ryzyko zgonu przy większej ilości nacieku limfocytów Th w podścielisku (sCD4) (współczynnik ryzyka (HR), 0.095; 95% CI, 0,02-0,49; $P = 0,005$).

Wnioski:

Założenia i cele pracy zostały spełnione. Znalezione trend w kierunku dłuższych czasów przeżyć DFS i OS dla SLT w porównaniu do SHT. Ta obserwacja jest zgodna z wynikami innych badań, które opisały dłuższe przeżycia dla SLT. Tak więc SHT pokazują trend w kierunku gorszego rokowania jeśli chodzi o DFS i OS. Ten trend został potwierdzony niezależnie od punktu odcięcia. Mimo, iż punkt odcięcia 40% nie uzyskał istotności statystycznej, wydawał się bardziej

adekwatnie dzielić nowotwory pod względem prognostycznym na SHT i SLT niż punkt odcięcia 50%. SLT cechowały się zdecydowanie bardziej obfitym naciekiem sTILs niż SHT. Ponadto, im więcej podścieliska w guzie, tym mniej obfity naciek limfocytów B w podścielisku, jak i średni naciek z obu przedziałów. Można wysnuć hipotezę, że im więcej podścieliska, tym trudniej jest dla TILs i dla limfocytów B naciekać nowotwór. Alternatywnie, im bardziej obfity naciek sTILs i limfocytów B, tym trudniej jest rozwinąć się podścielisku. Biorąc pod uwagę te wyniki, limfocyty B naciekające podścielisko w naszej grupie badawczej wydają się być związane z lepszym rokowaniem, gdyż jest ich więcej w SLT, które to nowotwory mają ogólnie lepsze rokowanie. Zdecydowanie mniejsze ryzyko zgonu zostało zaobserwowane dla nowotworów o większej ilości limfocytów Th (CD4) naciekających podścielisko (HR, 0.095; CI 95%, 0.02 – 0.49; P=0.005). Ten fakt można wytłumaczyć tym, że większość limfocytów Th w HNSCC to limfocyty T regulatorowe (Tregs), które zostały określone jako pozytywny marker prognostyczny w HNSCC w innych badaniach. Ta pozytywna wartość prognostyczna sCD4 może być również poparta faktem, iż limfocyty Th1, mające funkcję antynowotworową i przeciwdziałającą włóknieniu, mogą być potencjalnie bardziej liczne w podścielisku niż limfocyty Th2.

Podsumowując, TSR jest potencjalnie prognostycznym markerem u pacjentów z HNSCC po chirurgicznym wycięciu pierwotnego guza i adjuwantowej RT lub CRT. TSR, zwłaszcza w połączeniu z TILs i ich określonymi populacjami (sCD20, średnie CD20 i sCD4), mogłyby wspomóc ocenę ryzyka i tym samym stanowić podstawę do spersonalizowanego leczenia pacjentów z HNSCC.