



## **STATYSTYCZNA ANALIZA ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY OBRAZEM MORFOLOGICZNYM I ZMIANAMI CYTOGENETYCZNYMI W MIĘSAKACH TKANEK MIĘKKICH**

*Janusz Ryś, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie*

*Andrzej Sokołowski, Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie, Zakład Statystyki*

### **Wprowadzenie**

Złośliwe nowotwory tkanek miękkich (mięsaki) należą do rzadkich nowotworów (szacuje się, iż stanowią one niespełna 1% ogółu nowotworów złośliwych człowieka), tym niemniej w ostatnich dwudziestu latach obserwuje się stały wzrost liczby nowych zachorowań na tę grupę nowotworów. W USA, w populacji rasy białej, współczynniki zachorowalności na mięsaki tkanek miękkich, standaryzowane względem wieku, wzrosły w latach 1973–1998, odpowiednio dla kobiet z 1,75/100 000 do 2,5/100 000, zaś u mężczyzn z 2,0/100 000 do 3,0/100 000. Również w Polsce zachorowalność na nowotwory tkanki łącznej była w latach 1985–1994 o ok. 30% wyższa niż w okresie 1976–1984 r. Stały trend wzrostowy utrzymał się w Polsce także w latach 90. Dla porównania: w roku 1989 odnotowano 222 zachorowania na mięsaki tkanek miękkich u mężczyzn i 236 u kobiet (standaryzowane względem wieku współczynniki zachorowań wynosiły odpowiednio 1,1/100 000 oraz 1,0/100 000), natomiast w roku 1996 zarejestrowano 333 zachorowania u mężczyzn i 323 u kobiet (standaryzowane względem wieku współczynniki zachorowań wynosiły odpowiednio 1,6/100 000 oraz 1,3/100 000).

Można więc przypuszczać, iż w najbliższych latach mięsaki tkanek miękkich staną się poważnym problemem medycznym. Wynika to przede wszystkim z faktu, iż większość (ponad 50%) chorych na mięsaki tkanek miękkich umiera z powodu rozsiewu lub z powodu miejscowego szerzenia się nowotworu i zajęcia struktur ważnych dla życia. W 2001 roku w USA odnotowano 8700 nowych przypadków zachorowania na mięsaki tkanek miękkich. W tym samym czasie, według danych American Cancer Society, zmarło na mięsaki tkanek miękkich 4400 chorych. W Polsce w roku 1996 zmarło z powodu mięsaków 136 mężczyzn i 113 kobiet.

Niskie odsetki przeżyć 5-letnich u chorych na mięsaki tkanek miękkich spowodowane są przede wszystkim brakiem możliwości porównywania wyników leczenia prowadzonego w różnych ośrodkach i wypracowania standardów postępowania terapeutycznego. Wynika



to głównie z heterogennego charakteru tych nowotworów. Najnowsza klasyfikacja guzów tkanek miękkich, opublikowana w roku 2002 przez WHO, wyróżnia bowiem ponad 30 postaci histologicznych o różnej biologii i odmiennym rokowaniu. Sprawę komplikuje dodatkowo fakt, iż dotychczas nie udało się stworzyć idealnej klasyfikacji guzów tkanek miękkich, która by z jednej strony cechowała się prostotą, z drugiej zaś wysokim stopniem powtarzalności i przydatności klinicznej. Przy braku jednoznacznych (obiektywnych) kryteriów rozpoznania ocena typu histologicznego mięsaka ma czasem charakter arbitralny. Dowodem na to jest chociażby porównanie częstości występowania poszczególnych postaci histologicznych złośliwych nowotworów tkanek miękkich w doniesieniach pochodzących z różnych ośrodków. Według zgodnej opinii wszystkich autorów najczęstszym złośliwym nowotworem tkanek miękkich jest mięsak włóknisto-histiocytny; stanowi on od 25% do 28% badanych mięsaków. Odsetek diagnozowanych pozostałych mięsaków (a zarazem ich kolejność na liście częstości występowania) wykazuje natomiast znaczne różnice w poszczególnych ośrodkach (tabela 1).

Tabela 1. Rozbieżności w częstości występowania histologicznych podtypów mięsaków tkanek miękkich.

Typ histologiczny	Odsetek wg Coindre	Odsetek wg Hashimoto	Odsetek wg Markhede
Malignant fibrous histiocyoma	28,15	25,1	35,0
Liposarcoma	15,16	11,6	16,5
Leiomyosarcoma	11,94	9,1	9,3
Unclassified sarcoma	11,29	7,8	
Synovial sarcoma	10,08	6,5	5,2
Malignant peripheral nerve sheath tumor	5,81	5,9	7,2
Rhabdomyosarcoma	4,84	9,7	
Fibrosarcoma	3,06	5,2	
Ewing sarcoma	2,02	1,2	
Angiosarcoma	2,02	3,0	
Osteosarcoma	1,13	0,5	
Epithelioid sarcoma	1,13	1,2	
Chondrosarcoma	1,05	3,3	
Clear cell sarcoma	0,97	1,8	
Alveolar soft part sarcoma	0,56	1,0	
Malignant hemangiopericytoma	0,40	2,3	
Myxofibrosarcoma	-	-	11,3

Źródło: Coindre J.M. i wsp. *Cancer* 2001; 91:1914, Hashimoto H. i wsp. *Cancer* 1992, 70: 2816. Markhede G. i wsp., *Cancer* 1982, 49:1721.

Różnice te mogą po części wynikać z odmienności populacyjnych, tym niemniej jednak w większym stopniu wynikają one ze zmieniających się kryteriów diagnostycznych.



Początkowo podstawą klasyfikacji nowotworów tkanek miękkich była bowiem jedynie analiza obrazu histologicznego guza i jego ultrastruktury, w trakcie której koncentrowano się na ocenie zdolności komórek nowotworowych do tworzenia struktur imitujących prawidłowe tkanki pochodzenia mezenchymalnego. Od połowy lat 70. do diagnostyki nowotworów zaczęto wykorzystywać badania immunohistochemiczne; w szerszym stopniu wykorzystywane są one jednak dopiero od lat 90., zwanych okresem tzw. „brązowej rewolucji” w immunohistochemii, związanej z wprowadzeniem zarówno szerokiej gamy przeciwciał diagnostycznych, jak i wysoce czułych systemów detekcyjnych.

Badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym, a także badania immunohistochemiczne pozwalają w sposób wiarygodny diagnozować nowotwory o wyższym stopniu zróżnicowania, w głównej mierze ograniczone do dwóch grup mięsaków: nabłonkopodobnych i wrzecionowatokomórkowych. Natomiast wartość diagnostyczna wymienionych badań w różnicowaniu mięsaków pleomorficznych i mięsaków drobnookrągłokomórkowych jest w znacznej mierze ograniczona. Nadzieję na precyzyjną diagnostykę tych mięsaków przyniosły badania cytogenetyczne i molekularne, oparte na poszukiwaniu specyficznych translokacji chromosomowych lub genów fuzyjnych, powstałych w wyniku tych translokacji. Tym niemniej, dotychczas udało się wykryć wspomniane translokacje chromosomowe jedynie w odniesieniu do niektórych mięsaków, m.in. mięsaka maziówkowego (ang. *synovial sarcoma*), tłuszczakomięsaka (ang. *liposarcoma*), mięsaka mięśniowego prążkowanokomórkowego (ang. *rhabdomyosarcoma*), desmoplastycznego guza z małych okrągłych komórek (ang. *small desmoplastic round cell tumor*), mięsaka jasnokomórkowego (ang. *clear cell sarcoma*) oraz pozaszkieletowych odmian mięsaka Ewinga (ang. *extraskkeletal Ewing sarcoma/PNET*) i mezenchymalnego śluzowatego chrząstniakomięsaka (ang. *extraskkeletal myxoid chondrosarcoma*). W pozostałych przypadkach obserwuje się bądź brak aberracji chromosomowych, bądź obecność aberracji złożonych. Podejmowane były próby zidentyfikowania aberracji chromosomowych swoistych dla pozostałych mięsaków, jednak ze względu na rzadkość występowania tych guzów, wymagają one prowadzenia wieloletnich badań wielośrodkowych.

Osobnym zagadnieniem jest ocena rokowania u chorych na mięsaki tkanek miękkich, przy czym na plan pierwszy wysuwa się konieczność wykrycia takich czynników kliniczno-morfologicznych, które już w chwili rozpoznania pozwolą na wyróżnienie podgrupy chorych o wysokim ryzyku nawrotu choroby. W ostatnim dziesięcioleciu ukazało się co najmniej kilkanaście doniesień obejmujących wyniki wieloparametrowych analiz czynników rokowniczych u chorych na mięsaki tkanek miękkich, tym niemniej do wyjątków należą opracowania oparte na grupach większych niż 300 chorych. Kwestią otwartą pozostaje znaczenie rokownicze parametrów morfologicznych, cytogenetycznych i molekularnych. Według niektórych doniesień o rokowaniu u chorych na mięsaki tkanek miękkich decyduje sama postać histologiczna guza, a także naciekanie naczyń krwionośnych i osłonek nerwowych przez komórki mięsaka i obecność utkania nowotworu w marginesie preparatu operacyjnego, potwierdzona badaniem mikroskopowym. Przypuszcza się, iż u chorych na mięsaki o odmiennym utkaniu histologicznym o rokowaniu mogą decydować odmienne parametry morfologiczne, a także molekularne.



W przeciwieństwie do uznanej roli badań cytogenetycznych w diagnostyce różnicowej niektórych mięsaków tkanek miękkich, niewiele wiadomo o wartości prognostycznej zaburzeń cytogenetycznych u chorych na mięsaki. Doniesienia na temat wartości prognostycznej zaburzeń chromosomalnych w mięsakah tkanek miękkich mają charakter kazuistyczny. Wg Martensa i wsp. (*Cancer Res* 2002, 62 (14): 3980) pęknięcia w obrębie obszarów chromosomów 1p1, 1q4, 14q1 i 17q2, a także delecja regionu 6p12 mogą odgrywać rolę niezależnych czynników prognostycznych.

## Zagadnienia badawcze

1. W odniesieniu do diagnostyki mięsaków na plan pierwszy wysuwa się konieczność poszukiwania specyficznych aberracji chromosomowych, zwłaszcza dla najczęstszych mięsaków, w których nie wykryto dotychczas tzw. specyficznych translokacji, tj. dla mięsaków o różnicowaniu nerwowym (ang. *malignant schwannoma*, MPNST), mięsaków z komórek mięśni gładkich (ang. *leiomyosarcoma*) oraz śluzakowłókniakomięsaków (ang. *myxofibrosarcoma*).
2. Z klinicznego punktu widzenia najistotniejszym problemem jest wypracowanie wieloparametrowych modeli prognostycznych, tak dla ogółu złośliwych nowotworów tkanek miękkich, jak i dla podgrup mięsaków o różnym stopniu złośliwości histologicznej (G1 vs G2+G3) i o różnym utkaniu histologicznym guza pierwotnego (*synovial sarcoma*, *liposarcoma*, MFH, *myxofibrosarcoma*). Modele te winny obejmować uznane prognostyczne czynniki kliniczne, morfologiczne, cytogenetyczne i molekularne.
3. Ze względów poznawczych (naukowych) istotne jest badanie zależności pomiędzy wybranymi, znanymi parametrami kliniczno-morfologicznymi i stwierdzonymi aberracjami chromosomalnymi.

## Zasady tworzenia bazy danych

Ad 1. Celem poszukiwania aberracji chromosomowych (miejsc pęknięcia chromosomu) mogących brać udział w specyficznej translokacji wszystkie 23 pary chromosomów (22 chromosomy autosomalne oraz chromosomy X i Y) podzielono na prążki (zmiany w każdym z badanych prążków potraktowano jako osobną zmienną). Osobno zakodowano zmiany ilościowe, tj. zarówno utraty poszczególnych chromosomów lub ich fragmentów, jak i pojawianie się ich dodatkowych kopii.

Ad 2. W analizie przeżyć u chorych na mięsaki tkanek miękkich uwzględniono szereg parametrów kliniczno-morfologicznych, w tym wybrane zmienne kategoryjne (zaawansowanie kliniczne choroby w chwili rozpoznania, lokalizacja guza, postać histologiczna i stopień zróżnicowania nowotworu, obecność zatorów z komórek nowotworowych w świetle naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz naciekanie osłonek nerwowych przez komórki mięsaka, a także rodzaj aberracji chromosomowych) i zmienne ciągłe (wiek chorych, średnica guza, odsetek proliferujących komórek nowotworowych mierzony indeksem



mitotycznym, indeksem MiB1 oraz indeksem komórek w fazie S i G2M cyklu komórkowego, rozległość pól martwicy tkanki nowotworowej).

## Wybrane wyniki analizy statystycznej w badanej grupie chorych na mięsaki tkanek miękkich

Ad 2. W badanej grupie chorych na mięsaki tkanek miękkich czynnikami wpływającymi niezależnie na odsetek przeżyć całkowitych okazały się być:

- ◆ stopień zaawansowanie klinicznego choroby wg klasyfikacji TNM (WHO, 2002),
- ◆ obecność lub brak zatorów z komórek guza w świetle naczyń krwionośnych,
- ◆ wystąpienie aberracji strukturalnych w chromosomie 1 oraz w prążkach 14q10 oraz 18q11 (tabela 2).

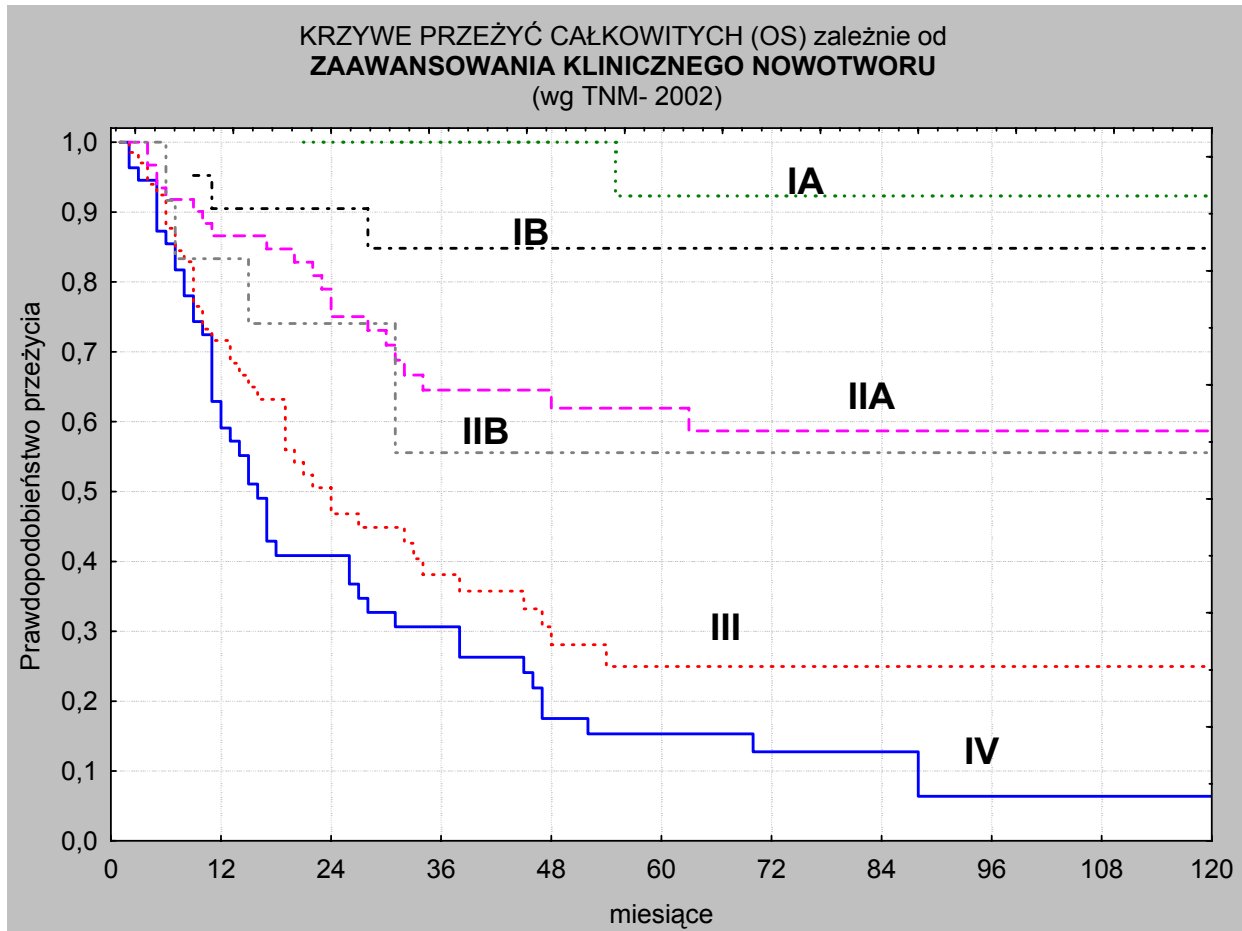
Tabela 2. Czynniki wpływające niezależnie na odsetek 5-letnich przeżyć całkowitych u chorych na mięsaki tkanek miękkich – model wieloparametrowy Coxa.

Cecha statystyczna	Warianty	Względne ryzyko zgonu	Wartość p
Zaawansowanie kliniczne *	Stopień I-IIIB	1.00	-
	Stopień III	4.01	0,0000
	Stopień IV	7.03	0,0000
Zatory z komórek mięsaka w naczyniach żylnych	Brak zatorów	1.00	-
	Obecne zatory	2.84	0,0000
Aberracje strukturalne w chromosomie 1	Brak aberracji	1.00	-
	Obecne aberracje	2.21	0,0003
Aberracje strukturalne2 w prążku 14q10**	Brak aberracji	1.00	-
	Obecne aberracje	5.05	0,0015
Aberracje strukturalne w prążku 18q11**	Brak aberracji	1.00	-
	Obecne aberracje	2.09	0,0043

\* Zawansowanie kliniczne oceniane wg klasyfikacji TNM z roku 2002.

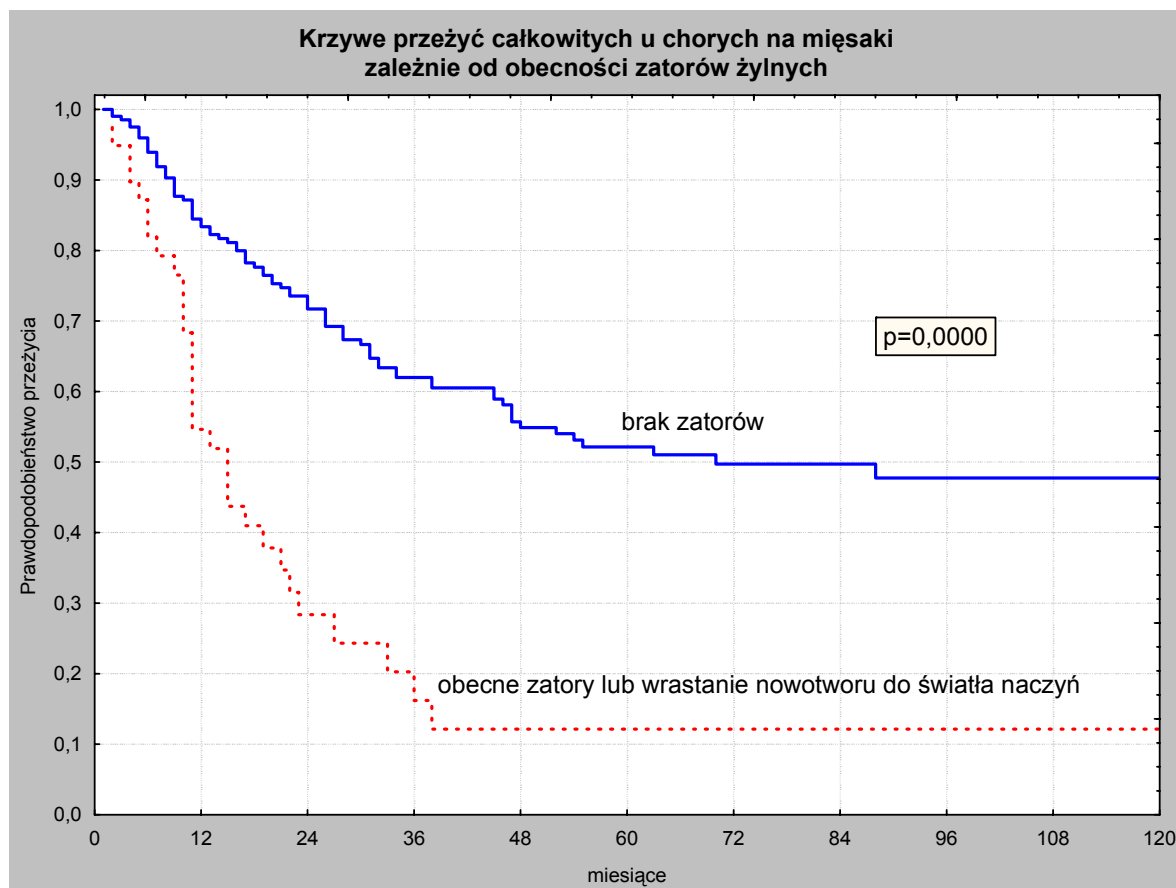
\*\* Swoista aberracja dla mięsaka maziówkowego.

Do wieloczynnikowego modelu Coxa dochodzimy poprzez analizy jednowymiarowe. Sprawdzany jest wpływ każdej pojedynczej zmiennej na przeżycia. Dla zmiennych ciągłych robi się to poprzez szacowanie kolejnych modeli jednoczynnikowych, natomiast dla zmiennych kategorizowanych poprzez zastosowanie testu log-rank. Rys. 1 ilustruje przebieg krzywych przeżyć w zależności od zaawansowania klinicznego nowotworu.



Rys. 1. Krzywe przeżyć całkowitych w badanej grupie chorych na mięsaki tkanek miękkich zależnie od zaawansowania choroby w chwili rozpoznania.

Przy zmiennych wielowariantowych każdy wariant kodowany jest osobno jako zmienna zero-jedynkowa. Na listę zmiennych objaśniających do wstępnego wieloczynnikowego modelu Coxa trafiają te zmienne, które w analizie jednowymiarowej wykazały istotności statystyczne wpływu na przeżycia przynajmniej na poziomie istotności 0,05. Następnie poprzez zastosowanie regresji krokowej zstępującej z modelu wieloczynnikowego eliminuje się zmienne nieistotne (po jednej). Niekiedy zachodzi też konieczność łączenia pewnych kategorii zmiennych. Z takim przypadkiem mamy do czynienia w modelu przedstawionym w tabeli 2, gdzie, jak widzimy, zaawansowanie kliniczne nowotworu ostatecznie przedstawiono w trzech kategoriach. Prostsza jest sytuacja w odniesieniu do zmiennych dychotomicznych, których warianty nie mogą podlegać grupowaniu – co najwyżej zmienna nieistotna usuwana jest z modelu. Rys. 2 pokazuje, jak różnią się krzywe przeżyć w zależności od obecności zatorów żylnych. Jak widać, różnica w przeżyciach jest bardzo wyraźna i zmienna ta pozostała w ostatecznym modelu Coxa.



Rys. 2. Krzywe przeżyć całkowitych w badanej grupie chorych na mięsaki tkanek miękkich zależnie od obecności zatorów z komórek mięsaka w świetle naczyń guza.

Ad 3. Badanie zależności pomiędzy wybranymi, znanymi parametrami kliniczno-morfologicznymi i stwierdzonymi aberracjami chromosomalnymi.

Baza danych opisująca aberracje chromosomowe zawiera około 400 opisujących je zmiennych (jak opisano powyżej, dotyczą one uszkodzeń w konkretnych fragmentach chromosomów i zmian ilościowych). Zmienne te są zerojedynkowe. Przy badaniu ich związków ze zmiennymi ciągłymi zastosowano test dla dwóch średnich w wersji parametrycznej, z oddzielną estymacją wariancji. Przy dużej liczbie obserwacji, którą dysponujemy, test ten jest odporny na ewentualne odstępstwa od normalności rozkładu. Przy zmiennych jakościowych stosujemy test niezależności chi-kwadrat.

Jako przykładowe przytaczamy wyniki oceny zależności pomiędzy zmianami strukturalnymi w chromosomie 1 a wybranymi parametrami kliniczno-morfologicznymi u chorych na mięsaki tkanek miękkich: stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu (stopień zróżnicowania oceniany w skali 1-8), nasileniem proliferacji komórek nowotworowych (indeks mitotyczny, indeks ekspresji antygenu proliferacyjnego MiB1, odsetek komórek w fazie S cyklu) i rozległości martwicy.



Tabela 3. Wyniki testu dla dwóch średnich.

Zmienna	Wartość średnia w mięsakach nie wykazujących zmian strukturalnych w chromosomie 1	Wartość średnia w mięsakach ze zmianami strukturalnymi w chromosomie 1	Wartość p	Liczba guzów z aberracją	Liczba guzów bez aberracji
Stopień zróżnicowania w punktach	5,1	6,1	0,0000	185	62
Indeks mitotyczny	23,5	44,7	0,0000	185	62
Indeks MiB1	27,5	39,2	0,0000	176	61
Odsetek komórek w fazie S	5,2	8,5	0,0014	115	34
Rozległość martwicy tkanki nowotworowej (%)	14,3	24,7	0,0005	186	62

W tabeli 4 pokazano wyniki analizy związku pomiędzy wystąpieniem zmian strukturalnych w obrębie chromosomu 1 a aberracjami wtórnymi.

Tabela 4. Wyniki testu niezależności chi-kwadrat.

<i>p=0,0001</i>	Brak zmian w chromosomie 1	Zmiany strukturalne w chromosomie 1	Sumy w wierszach
Stwierdzone aberracje wtórne	48 (57,1%)	36 (42,9%)	84
Brak wtórnych aberracji	192 (79,3%)	50 (20,7%)	242
Sumy w kolumnach	240	86	326

## Uwagi końcowe

Zastosowane metody statystyczne pozwoliły na wskazanie nowych elementów w rozważanym zagadnieniu. Zidentyfikowano zaburzenia genetyczne wpływające na przeżycia. Pełny wykaz tych istotnych zmian w chromosomach zostanie przedstawiony w prezentacji. Rozpoczęto również poszukiwanie swoistych zmian cytogenetycznych w typach mięsaków, co do których nie ma jeszcze w literaturze jednoznacznych wyników.



Przy analizie tak dużej liczby zmiennych i ich wzajemnych związków rodzi się pytanie o ewentualne stosowanie poprawki na testowanie wielokrotne. Po dogłębnym rozważeniu problemu zdecydowano się nie stosować tej poprawki. W istocie i teorii testowania hipotez statystycznych tkwi immanentnie błąd I rodzaju, polegający na niesłusznym odrzuceniu hipotezy zerowej, co w naszym zagadnieniu oznacza niesłuszne uznanie zmian w danym fragmencie chromosomu za istotne. Ryzyko popełnienia tego błędu mierzone jest poziomem istotności przyjmowanym powszechnie jako 0,05. Wprowadzenie poprawki na testowanie wielokrotne (podwyższające uzyskaną wartość  $p$ ) paradoksalnie uzależnia wynik testowania od liczby weryfikowanych (innych) hipotez. W naszych analizach stosowane „masowo” testy statystyczne wskazują wstępnie „podejrzane” miejsca uszkodzeń chromosomów. Dalsza weryfikacja następuje poprzez analizę merytoryczną oraz modele wieloczynnikowe.