

Analiza ekspresji genu *FGFR2* u chorych na raka żołądka leczonych chemioterapią pierwszej linii opartą na fluoropirymidynie

FGFR2 gene expression analysis in colon cancer patients treated with first-line chemotherapy based on fluoropyrimidine

Marzenna Jesiotr,¹ Monika Supińska,² Szczepan Cierniak,¹ Andrzej Mróz,³ Maciej Wieczorek,² Paweł Chrom,⁴ Aleksandra Stańczak,² Lubomir Bodnar⁴

¹Zakład Patomorfologii CSK MON WIM w Warszawie; kierownik: cz.p.o. ppłk. dr n. med. Szczepan Cierniak

²Celon Pharma S.A., Dział Badań Przedklinicznych; kierownik działu: dr n. med. Jerzy Pieczykolan

³Zakład Patologii COI w Warszawie; kierownik: prof. dr hab. n. med. Monika Prochorec-Sobieszek

⁴Klinika Onkologii CSK MON WIM; kierownik: prof. dr hab. n. med. Cezary Szczylik

Streszczenie. Cel. Celem badania była ocena częstości i znaczenia ekspresji receptora *FGFR2* oraz amplifikacji jego genu jako potencjalnego czynnika prognostycznego i predykcyjnego. Metody. Obecność amplifikacji genu *FGFR2* i ekspresji receptora *FGFR2* oceniano w tkankach utrwalonych w formalinie, w bloczkach parafinowych, stosując odpowiednio oznaczenia metodą FISH i immunohistochemiczne w kohorcie zaawansowanego raka żołądka. W pilotażowym badaniu przeanalizowano dane kliniczne 36 chorych poddanych chemioterapii pierwszej linii pochodnymi fluoropirymidyny. Wyniki. Jeden z 36 chorych (3%) wykazał amplifikację genu *FGFR2*. Ekspresję receptora *FGFR2* obserwowano u 11% (4/36) chorych, zaś nadekspresję tego receptora u 6% (2/36). W analizie jednoczynnikowej ekspresja receptora *FGFR2* nie miała istotnego wpływu na PFS i OS. Analiza wieloczynnikowa wskazała, że ekspresja *FGFR2* nie była niezależnym czynnikiem predykcyjnym i prognostycznym odpowiednio dla PFS i OS. Wnioski. Ekspresja *FGFR2* nie okazała się niezależnym prognostykiem predykcyjnym u pacjentów z zaawansowanym rakiem żołądka leczonych paliatywną chemioterapią opartą na fluoropirymidynie.

Słowa kluczowe: rak żołądka, amplifikacja genu *FGFR2*, ekspresja receptora *FGFR2*

Abstract. Background. The aim of the study was an assessment of frequency and significance of *FGFR2* receptor expression and its gene amplification as a potential prognostic and predictor factor. Methods. The presence of *FGFR2* gene amplification and expression *FGFR2* receptor was assessed in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using, respectively, a FISH assay and an IHC in an advanced gastric cancer cohort. In this pilot study, clinical data of 36 patients treated with first-line chemotherapy based on fluoropyrimidine derivatives was analyzed. Results. One of 36 patients (3%) exhibited *FGFR2* amplification. *FGFR2* receptor expression was observed in 11% (4/36) patients, and overexpression of this receptor was observed in 6% (2/36) of them. In univariate analysis, PFS and OS did not differ between expressed *FGFR2* and no expression groups. Multivariate analysis indicated that *FGFR2* expression was not an independent predictor and prognostic factor for PFS and OS, respectively. Conclusion. *FGFR2* expression does not appear to be an independent prognostic and predictor in patients with advanced gastric cancer treated with palliative fluoropyrimidine chemotherapy. **Key words:** gastric cancer, *FGFR2* gene amplification, *FGFR2* receptor expression

Nadesłano: 28.08.2017. Przyjęto do druku: 9.04.2018

Nie zgłoszono sprzeczności interesów.

Lek. Wojsk., 2018; 96 (2): 112–119

Copyright by Wojskowy Instytut Medyczny

Adres do korespondencji

mgr inż. Marzenna Jesiotr
Zakład Patomorfologii CSK MON WIM
Pracownia Genetyki Molekularnej
ul. Szaserów 128, 04-141 Warszawa
tel. +48 261 816 626
e-mail: mcichowicz@wim.mil.pl

Wstęp

Na świecie rak żołądka jest piątym najczęstszym nowotworem i trzecią przyczyną zgonów nowotworowych, powodującym około 723 tys. zgonów rocznie [1]. Udział raka żołądka w zachorowaniach na nowotwory w Polsce zmniejszył się w ciągu ostatnich 4 dekad niemal 3-krotnie. Obecnie nowotwory złośliwe żołądka stanowią u mężczyzn około 5% zachorowań, u kobiet zaś 3%. Liczba zachorowań na nowotwory złośliwe żołądka wynosiła w 2010 roku około 3400 u mężczyzn i około 1900 u kobiet. Przeżycia 5-letnie wśród chorych z nowotworami żołądka w ciągu pierwszej dekady XXI wieku nieznacznie się zwiększyły: u mężczyzn z 14,6% do 16,4%, natomiast u kobiet z 18,2% do 19,8% [2].

U chorych z zaawansowanym rakiem żołądka stosuje się systemową chemioterapię paliatywną mającą na celu przedłużenie życia oraz poprawienie jego komfortu. Obecnie standardem chemioterapii pierwszej linii są schematy terapeutyczne oparte na fluoropirymidynie oraz pochodnych platyny. Co najmniej połowa chorych kwalifikuje się do leczenia drugiej linii. Mimo leczenia rokowanie jest złe i charakteryzuje się przeżyciem całkowitym w granicach 10–13 miesięcy [3].

FGF odgrywają istotną rolę w patogenezie różnych chorób żołądka, w tym nowotworów. W eksperymentach na liniach komórkowych wykazano, że FGF-1 i FGF-2 uczestniczą w regulacji adhezji, różnicowania i naciekania komórek nowotworowych. W badaniu na liniach komórkowych raka żołądka stwierdzono, że Ki23057, inhibitor receptora FGFR2, może przełamywać oporność komórek nowotworowych na irinotecan, paklitaksel i etopozyd. Głównym mechanizmem leżącym u podstawy efektu synergistycznego takiego skojarzenia terapeutycznego jest wywoływanie apoptozy [4].

Ekspresję białka FGFR2 w ocenie immunohistochemicznej stwierdza się w komórkach raka żołądka u 31–51% chorych w tkankach guza pierwotnego. Wśród najistotniejszych zmian dotyczących genu *FGFR2* obserwuje się amplifikację, która występuje u około 4–7% chorych i może być niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [5].

Celem pracy była wstępna analiza częstości występowania ekspresji białka FGFR2 oraz amplifikacji jego genu w zestawieniu z parametrami kliniczno-patologicznymi chorych z zaawansowanym rakiem żołądka leczonych chemioterapią pierwszej linii opartą na fluoropirymidynie.

Materiał i metody

Analizie retrospektywnej poddano kohortę kolejnych chorych z miejscowo zaawansowanym lub przerzutowym rakiem żołądka, którzy byli leczeni w Klinice Onkologii WIM w latach 2010–2015.

Kryteriami włączenia do badania były:

- histopatologiczne potwierdzenie raka żołądka,
- obecność raka żołądka w stadium miejscowo zaawansowanym (nieresekcyjnym) lub przerzutowym,
- zaawansowanie choroby potwierdzone obiektywnymi badaniami radiologicznymi (tomografia komputerowa klatki piersiowej, jamy brzusznej i miednicy),
- rozpoczęcie pierwszej linii chemioterapii paliatywnej z użyciem fluoropirymidyny w okresie od 1.01.2010 do 31.12.2015 roku,
- przyjęcie co najmniej jednego pełnego cyklu leczenia pierwszej linii chemioterapii paliatywnej z użyciem fluoropirymidyny,
- nieobecność innych nowotworów złośliwych z wyjątkiem raka podstawnokomórkowego skóry lub *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN).

Kryteriami wyłączenia były:

- rozpoczęcie pierwszej linii chemioterapii paliatywnej z użyciem innych cytostatyków niż fluoropirymidyny,
- rozpoczęcie pierwszej linii chemioterapii paliatywnej przed 1.01.2010 roku lub po 31.12.2015 roku,
- zakończenie chemioterapii adjuwantowej w okresie poniżej 6 miesięcy od rozpoczęcia pierwszej linii chemioterapii paliatywnej z użyciem fluoropirymidyny,
- przyjęcie pierwszego cyklu pierwszej linii chemioterapii paliatywnej z użyciem fluoropirymidyny w innym ośrodku niż Klinika Onkologii WIM w Warszawie.

Materiał tkankowy guzów nowotworowych dostępny z blozków parafinowych w Zakładzie Patologii WIM pierwszej kohorty badania, tj. 36 chorych, skrojono na szkiełka silanizowane. Po przygotowaniu preparatów przystąpiono do wykonania oznaczeń genu *FGFR2* metodą FISH. Oceniano sygnały w 50 komórkach, zliczając sygnały FGFR2 (kolor czerwony) i sygnały CEN10p (kolor zielony). Wynik stanowił wyliczony stosunek FGFR2/CEN10p.

Jednocześnie wykonano barwienia na obecność ekspresji FGFR2 z użyciem komercyjnie dostępnego przeciwciała w rozcieńczeniu 1:500 (Abcam ab 10647).

Metodyka oznaczeń immunohistochemicznych

Ocena immunohistochemiczna obejmowała intensywność barwienia, procent wybarwienia komórek nowotworowych oraz lokalizację barwienia. Preparaty były wstępnie oceniane w Laboratorium Badawczo-Rozwojowym Celon Pharma S.A., a następnie przez dwóch niezależnych patomorfologów (SC oraz AM).

Wypracowano metodykę oznaczania oraz zaproponowano dwie skale oceny ekspresji FGFR2 w komórkach raka żołądka: HercepTEST oraz H-Score.

Skala HercepTEST

Do oceny preparatów immunohistochemicznych zastosowano skalę 4-stopniową (0–3+):

- 0 – brak barwienia, niespecyficzne barwienie lub pojedyncze nieliczne komórki (<10%),
- 1+ – słabe barwienie cytoplazmatyczne, barwienie o umiarkowanej intensywności dotyczące $\geq 10\%$ komórek nowotworowych (uwagi: muszą być grupy/skupiska barwionych komórek nowotworowych),
- 2+ – barwienie błonowe o umiarkowanej intensywności (2+) dotyczące $>10\%$ komórek nowotworowych,
- 3+ – barwienie błonowe o silnej intensywności (3+) dotyczące $\geq 10\%$ komórek nowotworowych.

Skala H-Score

Skala uwzględniała zarówno intensywność wybarwienia, jak i procent wybarwionych komórek całej komponenty naciekowej raka, obejmującej zarówno intensywność odczynu immunohistochemicznego w skali od 0 do 3, jak i rozległość obszarów wspomnianych 4 typów odczynów w procentach powierzchni utkania naciekającego nowotworu. Na podstawie wzoru:

$HS = 1 \times Pi$ (słabo) + $2 \times Pi$ (średnio) + $3 \times Pi$ (silnie) określano tzw. indeks ekspresji immunohistochemicznej wykonanych odczynów. Wartość Pi oznaczała odsetek powierzchni komponenty inwazyjnej o odpowiedniej intensywności odczynu.

Analiza statystyczna

Metody statystyczne zastosowane w tym badaniu obejmowały statystyki opisowe. Do oceny funkcji przeżycia, mediany oraz 95% przedziału ufności dla czasu wolnego od progresji choroby (*progression-free survival* – PFS) oraz przeżycia całkowitego (*overall survival* – OS) użyto estymatora Kaplana i Meyera. Do porównania wpływu ekspresji badanych białek na powyższe parametry wykorzystano test log-rank. Po analizie jednoczynnikowej przeprowadzono test wieloczynnikowy proporcjonalnego hazardu Coxa do budowy modelu niezależnych czynników predykcyjnych i prognostycznych. Nieparametryczne testy statystyczne, takie jak test Manna i Whitneya, test chi-kwadrat, wykorzystano do oceny wpływu ekspresji FGFR2 i amplifikacji jego genu na parametry odpowiedzi klinicznej. Czynniki, które uzyskały istotność statystyczną ($p < 0,05$), uznano za niezależnie wpływające na PFS i OS. Analizy statystycznej dokonano przy zastosowaniu pakietu Statistica Statsoft wersja 12.0.

Wyniki**Charakterystyka badanej grupy**

Do badania pilotowego zakwalifikowano 36 kolejnych chorych na zaawansowanego lub przerzutowego raka

żołądka leczonych w Klinice Onkologii WIM chemioterapią paliatywną pierwszej linii z użyciem fluoropirymidyny, w przypadku których w Zakładzie Patologii WIM dostępny był materiał tkankowy z guza pierwotnego żołądka. Spośród 36 chorych 50% (18/36) stanowili mężczyźni i 50% (18/36) kobiety. Mediana wieku wyniosła 65,8 roku (przedział 29–84 lat). Stopień złośliwości histologicznej u 25% (9/36) chorych określono jako G2, a u 61% (22/36) jako G3. W przypadku 14% (5/36) chorych nie ustalono stopnia złośliwości G. Pierwotne zaawansowanie choroby określono jako T1 u 3% (1/36), T2 u 11% (4/36), T3 u 25% (9/26), a T4 u 61% (22/36) pacjentów. Zajęcie węzłów chłonnych stwierdzono u 61% (22/36) chorych. W tabeli 1. przedstawiono szczegółową charakterystykę badanej grupy.

Ocena ekspresji oraz amplifikacji genu *FGFR2* w komórkach raka żołądka

W analizowanej grupie przeprowadzono ocenę ekspresji receptora dla czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR2). Dodatknią ekspresję stwierdzono u 11% (4/36) chorych. Według skali HercepTEST nadekspresję zaobserwowano u 6% (2/36) chorych. Natomiast jedynie u jednego chorego wykryto amplifikację genu *FGFR2*, co stanowiło około 3% całej badanej grupy. U tego chorego w badanych tkankach nowotworowych stwierdzono również wysoką ekspresję błonową FGFR2 o *H-score* na poziomie 300. Dane przedstawiono w tabeli 2.

Analiza jednoczynnikowa dla PFS

W tabeli 3. przedstawiono wpływ analizowanych parametrów kliniczno-patologicznych na czas przeżycia wolny od progresji choroby przy zastosowaniu modelu proporcjonalnego hazardu Coxa. W badanej grupie zaobserwowano znaczenie predykcyjne dla lokalizacji zmian przerzutowych do płuc, jajników oraz liczby zajętych przestrzeni. Wśród analizowanych zmiennych nie stwierdzono istotnego wpływu predykcyjnego dla ekspresji FGFR2 (ryc. 1.), wieku, płci, stopnia złośliwości histologicznej (G), wielkości guza, obecności przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych, wykonanej gastrektomii, obecności wodobrzusza, stanu sprawności ogólnej, a także obecności przerzutów w takich lokalizacjach, jak otrzewna, odległe węzły chłonne, kości, wątroba i trzustka.

Do analizy wieloczynnikowej według proporcjonalnego hazardu Coxa włączono wszystkie czynniki wyłonione na podstawie analizy jednoczynnikowej, które wykazywały statystycznie znamienne wpływ na czas przeżycia wolny od progresji choroby (tj. obecność przerzutów do płuc, jajników, liczbę zajętych przestrzeni przez przerzuty) oraz ekspresję białka FGFR2. Na podstawie analizy wieloczynnikowej wykazano, że dwie zmienne, takie jak obecność przerzutów do płuc oraz do jajników,

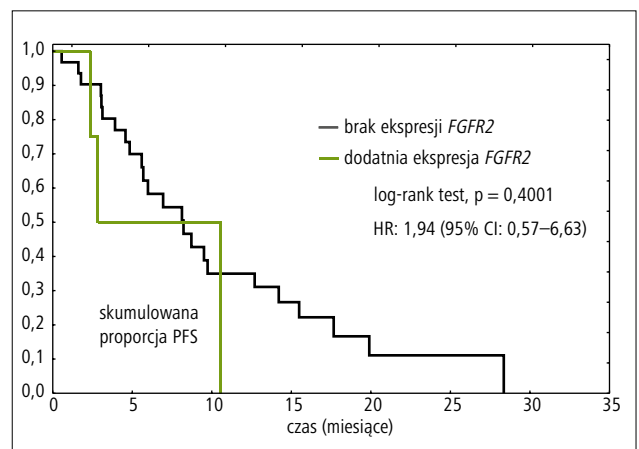
Tabela 1. Charakterystyka badanej grupy (N = 36)
Table 1. Examined group description (N = 36)

| parametr | N | % |
|----------------------------|------|-------|
| pleć | | |
| kobiety | 18 | 50 |
| mężczyźni | 18 | 50 |
| wiek (mediana, przedział) | 65,8 | 29–84 |
| stopień złośliwości G | | |
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 9 | 25 |
| 3 | 22 | 61 |
| brak | 5 | 14 |
| wielkość guza (T) | | |
| 1 | 1 | 3 |
| 2 | 4 | 11 |
| 3 | 9 | 25 |
| 4 | 22 | 61 |
| cecha N | | |
| 0 | 10 | 28 |
| 1 | 5 | 14 |
| 2 | 6 | 17 |
| 3 | 11 | 31 |
| brak | 4 | 11 |
| gastrektomia | | |
| nie | 11 | 31 |
| tak | 25 | 69 |
| wodobrzusze | | |
| nie | 32 | 89 |
| tak | 4 | 11 |
| ECOG | | |
| 0 | 16 | 44 |
| 1 | 18 | 50 |
| 2 | 2 | 6 |
| wznowa miejscowa | | |
| nie | 29 | 81 |
| tak | 7 | 19 |
| przerzuty do płuc | | |
| nie | 32 | 89 |
| tak | 4 | 11 |
| przerzuty do ww. chłonnych | | |
| nie | 15 | 42 |
| tak | 21 | 58 |
| przerzuty do otrzewnej | | |
| nie | 27 | 75 |
| tak | 9 | 25 |
| przerzuty do wątroby | | |
| nie | 26 | 72 |
| tak | 10 | 28 |
| przerzuty do trzustki | | |
| nie | 34 | 94 |
| tak | 2 | 6 |
| przerzuty do kości | | |
| nie | 34 | 94 |
| tak | 2 | 6 |

Tabela 1. Charakterystyka badanej grupy (N = 36)
Table 1. Examined group description (N = 36)

| | | |
|--|----|----|
| przerzuty do jajnika | | |
| nie | 32 | 89 |
| tak | 4 | 11 |
| przerzuty do innych lokalizacji | | |
| nie | 30 | 83 |
| tak | 6 | 16 |
| liczba zajętych przestrzeni przerzutami nowotworowymi | | |
| 1 | 15 | 42 |
| 2 | 11 | 31 |
| 3 | 4 | 11 |
| 4 | 4 | 11 |
| 5 | 1 | 3 |
| 6 | 1 | 3 |

HR – ryzyko względne, ECOG – skala sprawności wg Eastern Cooperative Oncology Group



Rycina 1. Wpływ ekspresji *FGFR2* na czas przeżycia wolnego od progresji choroby przy zastosowaniu testu log-rank w estymatorze Kaplana-Meiera

Figure 1. *FGFR2* gene expression influence on progression-free survival using log-rank test with Kaplan-Meier estimator

były niezależnymi niekorzystnymi czynnikami predykcyjnymi dla czasu przeżycia wolnego od progresji choroby (HR [*hazard ratio* – ryzyko względne] wynosiło odpowiednio 4,49 [95% CI: 1,49–16,09] $p = 0,0090$ oraz 10,31 [95% CI: 2,83–37,58] $p = 0,0004$) (tab. 4.).

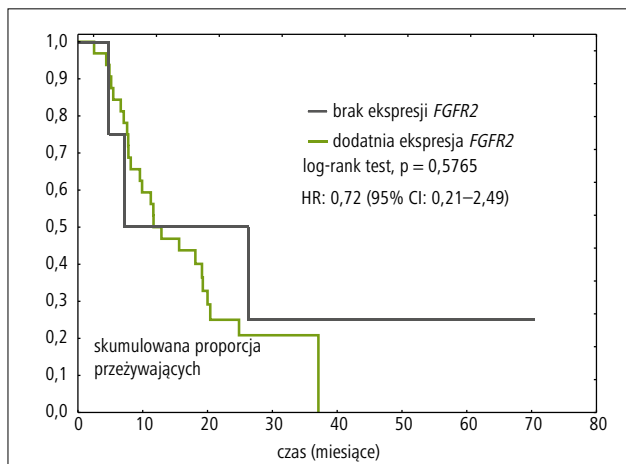
W oparciu o przeprowadzoną analizę jednoczynnikową zmiennych w odniesieniu do czasu całkowitego przeżycia w badanej grupie chorych stwierdzono, że gorszy stan sprawności ogólnej oraz obecność przerzutów do płuc związane były z krótszym OS. Pozostałe analizowane zmienne, takie jak ekspresja *FGFR2* (ryc. 2.), wiek, płeć, stopień złośliwości histologicznej (G), wielkość guza, przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych, wykonanie gastrektomii, wodobrzusze, a także obecność

Tabela 2. Ocena ekspresji i amplifikacji genu *FGFR2*
Table 2. *FGFR2* gene expression and amplification analysis

| parametr | N | % |
|---|----|----|
| ekspresja <i>FGFR2</i> wg <i>H-score</i> | | |
| 0 | 32 | 89 |
| 20 | 1 | 3 |
| 30 | 1 | 3 |
| 90 | 1 | 3 |
| 300 | 1 | 3 |
| nadekspresja <i>FGFR2</i> wg skali HerceptEST | | |
| brak | 34 | 94 |
| nadekspresja | 2 | 6 |
| amplifikacja genu <i>FGFR2</i> | | |
| nie | 35 | 97 |
| tak | 1 | 3 |

Tabela 3. Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla każdego z analizowanych czynników
Table 3. Cox regression (proportional hazards) model for each of analyzed factors

| parametr | HR | 95% CI | +95% CI | p |
|--------------------------------------|----------|----------|-----------|----------|
| płeć | | | | |
| kobiety | 1 | | | |
| mężczyźni | 0,763953 | 0,351342 | 1,661130 | 0,496893 |
| wiek | | | | |
| <65 | 1 | | | |
| >65 | 1,001769 | 0,454284 | 2,209063 | 0,9965 |
| stopień złośliwości G | | | | |
| 1–2 | 1 | | | |
| 3, nieokreślone | 1,304444 | 0,545443 | 3,1196218 | 0,550229 |
| wielkość guza (T) | | | | |
| 1–2 | 1 | | | |
| 3–4 | 1,002178 | 0,342243 | 2,934638 | 0,996834 |
| regionalne ww. chłonne | | | | |
| wolne | 1 | | | |
| dotądnie, brak danych | 0,668972 | 0,296202 | 1,510874 | 0,333481 |
| gastrektomia | | | | |
| nie | 1 | | | |
| tak | 0,732862 | 0,317005 | 1,694257 | 0,467308 |
| wodobrzusze | | | | |
| nie | 1 | | | |
| tak | 2,265073 | 0,486817 | 10,53899 | 0,297289 |
| ECOG | | | | |
| 0 | 1 | | | |
| 1 | 1 | | | |
| 2 | 3,659460 | 0,457144 | 29,29417 | 0,221563 |
| wznowa miejscowa | | | | |
| nie | 1 | | | |
| tak | 0,602946 | 0,224250 | 1,621158 | 0,316081 |
| przerzuty do płuc | | | | |
| nie | 1 | | | |
| tak | 7,387843 | 2,163083 | 25,23262 | 0,001419 |
| przerzuty do odległych ww. chłonnych | | | | |
| nie | 1 | | | |
| tak | 1,045108 | 0,480259 | 2,274298 | 0,911447 |
| przerzuty do otrzewnej | | | | |
| nie | 1 | | | |
| tak | 1,817696 | 0,778363 | 4,244830 | 0,167309 |
| przerzuty do wątroby | | | | |
| nie | 1 | | | |
| tak | 1,01658 | 0,253839 | 4,0712 | 0,981466 |
| przerzuty do trzustki | | | | |
| nie | 1 | | | |
| tak | 1,81113 | 0,230693 | 14,2188 | 0,572121 |



Rycina 2. Wpływ ekspresji *FGFR2* na czas przeżycia całkowitego przy zastosowaniu testu log-rank w estymatorze Kaplana-Meiera

Figure 2. *FGFR2* gene expression influence on overall survival using log-rank test with Kaplan-Meier estimator

przerzutów w takich lokalizacjach, jak otrzewna, odległe węzły chłonne, jajniki, kości, wątroba i trzustka, nie stanowiły czynników prognostycznych, ponieważ w przypadku żadnej z tych zmiennych nie wykazano znamienności statystycznej. Wyniki przeprowadzonej analizy jednoczynnikowej umieszczono w tabeli 5.

Do analizy wieloczynnikowej włączono zmienne, które wykazywały istotny statystycznie wpływ na czas przeżycia całkowitego w analizie jednoczynnikowej. Czynniki tymi były: stan sprawności ogólnej według ECOG, obecność przerzutów do płuc, a ze względu na prowadzone badanie dołączono ekspresję *FGFR2*. Na podstawie analizy wieloczynnikowej przeprowadzonej według

Tabela 3. Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla każdego z analizowanych czynników
Table 3. Cox regression (proportional hazards) model for each of analyzed factors

| parametr | HR | 95% CI | +95% CI | p |
|---------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| przerzuty do kości | | | | |
| nie | 1 | | | |
| tak | 0,34097 | 0,026499 | 4,3874 | 0,409112 |
| przerzuty do jajnika | | | | |
| nie | 1 | | | |
| tak | 3,370239 | 1,087386 | 10,44571 | 0,035289 |
| przerzuty do innych lokalizacji | | | | |
| nie | 1 | | | |
| tak | 0,61239 | 0,136805 | 2,7413 | 0,521346 |
| liczba zajętych przestrzeni | | | | |
| 1 | 1 | | | |
| więcej | 1,378731 | 1,006191 | 1,889203 | 0,045685 |
| FGFR2 (IHC) | | | | |
| brak | 1 | | | |
| dodatnia | 1,937339 | 0,566026 | 6,630934 | 0,292159 |

ECOG – skala sprawności wg Eastern Cooperative Oncology Group, FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*) – receptor czynnika wzrostu fibroblastów 2, HR – ryzyko względne, IHC – immunohistochemia

modelu proporcjonalnego hazardu Coxa stwierdzono, że niezależnymi niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi w badanej populacji ($p < 0,05$) były: gorszy stan sprawności ogólnej EGOG2 (HR = 22,06 [95% CI: 3,74–130,20]) i obecność przerzutów do płuc (HR = 7,36 [2,18–24,85]). Wyniki przeprowadzonej analizy wieloczynnikowej przedstawiono w tabeli 6.

Omówienie

Przeprowadzone badanie pilotowe na pierwszej kohorcie 36 włączonych chorych pokazuje, że ekspresja badanego białka FGFR2 występuje w badanej populacji na poziomie 11%. Natomiast badana amplifikacja genu *FGFR2* jest zjawiskiem rzadkim, w naszej grupie stwierdzono ją u 3% chorych.

Czynniki wzrostu fibroblastów (*fibroblast growth factor* – FGF) oraz ich receptory (*fibroblast growth factor receptor* – FGFR) odgrywają istotną rolę w przebiegu wielu procesów komórkowych. Regulują one między innymi proliferację, różnicowanie, przeżywalność i migrację komórek. Zaburzenia sygnalizacji szlaku FGF/FGFR mogą prowadzić do powstania wielu stanów patologicznych, w tym nowotworów. Nieprawidłową ekspresję

Tabela 4. Model analizy wieloczynnikowej
Table 4. Multivariate analysis model

| parametr | HR | 95% CI | +95% CI | p |
|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|
| przerzuty do jajnika | | | | |
| nie | | | | |
| tak | 4,89298 | 1,487543 | 16,09451 | 0,008962 |
| przerzuty do płuc | | | | |
| nie | | | | |
| tak | 10,31126 | 2,829067 | 37,58206 | 0,000407 |
| liczba zajętych przestrzeni | | | | |
| 1 | | | | |
| więcej | NS | NS | NS | NS |
| FGFR2 (IHC) | | | | |
| brak | | | | |
| dodatnia | NS | NS | NS | NS |

FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*) – receptor czynnika wzrostu fibroblastów 2, HR – ryzyko względne, IHC – immunohistochemia

receptorów FGFR i ich ligandów, a także mutacje w kodujących je genach, wykazano między innymi w przypadku raka prostaty, pęcherza moczowego, płuc czy raka żołądka [6].

Ahn i wsp. [7] stwierdzili rzadkie występowanie amplifikacji genu *FGFR2* podobnie jak w naszym badaniu na poziomie około 3% w grupie 1974 chorych na raka żołądka. Autorzy tej pracy zaobserwowali dużą korelację pomiędzy ekspresją receptora FGFR2b ocenianego immunohistochemicznie a amplifikacją genu *FGFR2* na poziomie 92%. Przy czym amplifikacja *FGFR2* była obecna u 100% chorych z ekspresją immunohistochemiczną receptora FGFR2b na poziomie 2+ lub 3+ (60 przypadków) oraz u 54% chorych wśród 13 przypadków z ekspresją 1+. Autorzy tego badania zaobserwowali znamienne niekorzystny wpływ wysokiej ekspresji receptora FGFR2b na przeżycie chorych.

Nieco wyższą amplifikację genu *FGFR2* niż w naszym badaniu na poziomie 4,9% (16/327) uzyskali Seo S. i wsp. [8] w grupie chorych na raka żołądka poddanych chemioterapii opartej na pochodnych platyny i fluoropirymidynie. W analizie jednoczynnikowej nie stwierdzono wpływu amplifikacji genu *FGFR2* na PFS, natomiast zaobserwowano statystycznie znamienne krótsze przeżycia w tej grupie chorych. W analizie wieloczynnikowej amplifikacja genu *FGFR2* nie okazała się jednak niezależnym czynnikiem prognostycznym.

Podobne wyniki do naszego badania amplifikacji *FGFR2* obserwowano w pracy Matsumoto i wsp. [9], którzy stwierdzili ją u 4% (11 z 267) chorych na raka żołądka. Autorzy stwierdzili tendencję do krótszego czasu

Tabela 5. Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla każdego z analizowanych czynników
Table 5. Cox regression (proportional hazards) model for each of analyzed factors

| parametr | HR | 95% CI | +95% CI | p |
|--|----------|----------|----------|----------|
| pleć kobiety mężczyźni | 0,623931 | 0,280482 | 1,387930 | 0,247541 |
| wiek <65 >65 | 0,749853 | 0,339260 | 1,657371 | 0,476833 |
| stopień złośliwości G 1–2 3, nieokreślone | 0,972215 | 0,393418 | 2,402537 | 0,951322 |
| wielkość guza (T) 1–2 3–4 | 0,703709 | 0,225927 | 2,191892 | 0,544401 |
| regionalne ww. chłonne wolne dodatnie, brak danych | 0,733647 | 0,320595 | 1,678876 | 0,463388 |
| gastrektomia nie tak | 0,745982 | 0,330936 | 1,681561 | 0,479769 |
| wodobrzusze nie tak | 2,45617 | 0,813927 | 7,41194 | 0,110809 |
| ECOG 0 1 2 | 14,38268 | 2,522808 | 81,99659 | 0,002685 |
| wznowa miejskowa nie tak | 0,420490 | 0,144092 | 1,227070 | 0,112869 |
| przerzuty do płuc nie tak | 5,684488 | 1,755419 | 18,40780 | 0,003751 |
| przerzuty do odległych ww. chłonnych nie tak | 1,409005 | 0,652739 | 3,041483 | 0,382458 |
| przerzuty do otrzewnej nie tak | 1,370333 | 0,598436 | 3,137866 | 0,456081 |
| przerzuty do wątroby nie tak | 1,330363 | 0,554315 | 3,19289 | 0,522793 |

Tabela 5. Model proporcjonalnego hazardu Coxa dla każdego z analizowanych czynników
Table 5. Cox regression (proportional hazards) model for each of analyzed factors

| parametr | HR | 95% CI | +95% CI | p |
|---|----------|----------|----------|----------|
| przerzuty do trzustki nie tak | 0,553316 | 0,038671 | 7,91710 | 0,662887 |
| przerzuty do kości nie tak | 3,250017 | 0,204260 | 51,71161 | 0,403791 |
| przerzuty do jajnika nie tak | 1,142805 | 0,338340 | 3,860031 | 0,829813 |
| przerzuty do innych lokalizacji nie tak | 0,931619 | 0,347920 | 2,494581 | 0,887912 |
| liczba zajętych przeźreni przez przerzuty 1 więcej | 1,444824 | 0,657113 | 3,176799 | 0,359982 |
| FGFR2 (IHC) brak dodatnia | 0,724827 | 0,210707 | 2,493386 | 0,609673 |

ECOG – skala sprawności wg Eastern Cooperative Oncology Group, FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*) – receptor czynnika wzrostu fibroblastów 2, HR – ryzyko względne, IHC – immunohistochemia

przeżycia chorych w tej podgrupie chorych, bez osiągnięcia różnicy znamiennej statystycznie.

Oceniając ekspresję receptorów dla FGFR1-4, Murase i wsp. [10] stwierdzili w grupie 222 chorych na raka żołądka, że poszczególne białka silnie korelują z innymi. Autorzy tej pracy stwierdzili znacznie wyższą ekspresję *FGFR2* niż zaobserwowana w naszym badaniu (odpowiednio 51% vs 11%). Badanie to wykazało, że nadekspresja FGFR1, FGFR2 lub FGFR4 znamienne wiązała się z większą agresywnością guza, w tym głębokością naciekania, przerzutami do węzłów chłonnych, stadium zaawansowania oraz obecnością przerzutów odległych. Pacjenci wykazujący nadekspresję FGFR1, FGFR2 lub FGFR4 wykazywali również istotnie krótsze przeżycie zależne od choroby (DSS) i był to niezależny zły czynnik prognostyczny.

Możliwości wykorzystania amplifikacji genu *FGFR2* w leczeniu na liniach komórkowych raka żołądka SNU-16 i KATO III z amplifikacją genu *FGFR2* przedstawili Xie

Tabela 6. Model analizy wieloczynnikowej dla przeżycia całkowitego

Table 6. Multivariate analysis model for overall survival

| parametr | HR | 95% CI | +95% CI | p |
|--------------------------|----------|----------|----------|----------|
| ECOG | 22,05702 | 3,736502 | 130,2053 | 0,000638 |
| przerzuty do płuc nie | | | | |
| tak | 7,36084 | 2,180118 | 24,8528 | 0,001304 |
| FGFR2 (IHC) brak | | | | |
| dodatnia | NS | NS | NS | NS |

ECOG – skala sprawności według Eastern Cooperative Oncology Group, FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*) – receptor czynnika wzrostu fibroblastów 2, HR – ryzyko względne, IHC – immunohistochemia

i wsp. [11] W warunkach *in vivo* stwierdzili oni zahamowanie wzrostu linii komórkowych poddanych swoistemu inhibitorowi AZD4547 z poziomami GI50 odpowiednio 3 i 5 nmol/l. AZD4547 skutecznie hamował fosforylację FGFR2 i kolejnych białek w szlaku sygnałowym oraz indukował apoptozę w komórkach SNU-16. Ponadto blokowanie receptora FGFR2 przez AZD4547 powodowało znaczne zahamowanie wzrostu nowotworu zależne od dawki w modelach doświadczalnych mysich z ksenograftami ze wszczepionymi komórkami raka żołądka z amplifikacją genu *FGFR2* (SNU-16) i *PDGFCX* (SGC083), ale bez tego efektu w modelach z guzami z komórek bez amplifikacji genu *FGFR2*. Zablockowanie *FGFR2* przez shRNA podobnie hamowało wzrost guza w warunkach zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Dodatkowo w porównaniu z monoterapią AZD4547 wykazano poprawę skuteczności przeciwnowotworowej w połączeniu z cytostatykami w warunkach *in vivo*.

Podsumowanie

W przeprowadzonym badaniu pilotażowym u chorych na zaawansowanego lub przerzutowego raka żołądka leczonych w Klinice Onkologii WIM chemioterapią paliatywną pierwszej linii z użyciem fluoropirymidyny stwierdzono dodatnią ekspresję receptora FGFR2 u 11% (4/36) chorych, zaś nadekspresję tego receptora u 6% (2/36) chorych. Tylko u jednego chorego wykryto amplifikację genu *FGFR2* (ok. 3% całej badanej grupy). U chorego tego stwierdzono w badanych tkankach nowotworowych związek z dużą ekspresją błonową FGFR2 o *H-score* na poziomie 300. Dodatnia ekspresja FGFR2 nie miała w badanej grupie znamiennego wpływu na czas przeżycia wolnego od progresji choroby oraz na czas przeżycia całkowitego. Na podstawie analizy wieloczynnikowej stwierdzono, że dwie zmienne kliniczno-patologiczne – obecność przerzutów do płuc oraz do jajników – były

niezależnymi niekorzystnymi czynnikami predykcyjnymi dla czasu przeżycia wolnego od progresji choroby. Gorszy stan sprawności ogólnej oraz obecność przerzutów do płuc związane były natomiast z krótszym czasem przeżycia całkowitego.

Badanie zrealizowano w ramach programu STRATEGMED2/266776/17/NCBR/2015 finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

Piśmiennictwo

1. Fact sheets by cancer (n.d.). www.globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (accessed July 30, 2017)
2. Raporty | KRN (n.d.). www.onkologia.org.pl/raporty/#tabela_rok (accessed May 10, 2016)
3. Chrom P, Stec R, Szczylik C. Second-line treatment of advanced gastric cancer: current options and future perspectives. *Anticancer Res*, 2015; 35: 4575–4583
4. Korc M, Friesel RE. The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009; 9: 639–651
5. Inokuchi M, Fujimori Y, Otsuki S, et al. Therapeutic targeting of fibroblast growth factor receptors in gastric cancer. *Gastroenterol Res Pract*, 2015: 796380
6. Brooks AN, Kilgour E, Smith PD. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res*, 2012; 18: 1855–1862
7. Ahn S, Lee J, Hong M, et al. FGFR2 in gastric cancer: protein overexpression predicts gene amplification and high H-index predicts poor survival. *Mod Pathol*, 2016; 29: 1095–1103
8. Seo S, Park SJ, Ryu M-H, et al. Prognostic impact of fibroblast growth factor receptor 2 gene amplification in patients receiving fluoropyrimidine and platinum chemotherapy for metastatic and locally advanced unresectable gastric cancers. *Oncotarget*, 2017; 8 (20): 33844–33854
9. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, et al. FGFR2 gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br J Cancer*, 2017; 106: 727–732
10. Murase H, Inokuchi M, Takagi Y, et al. Prognostic significance of the co-overexpression of fibroblast growth factor receptors 1, 2 and 4 in gastric cancer. *Mol Clin Oncol*, 2014; 2: 509–517
11. Xie L, Su X, Zhang L, et al. FGFR2 gene amplification in gastric cancer predicts sensitivity to the selective FGFR inhibitor AZD4547. *Clin Cancer Res*, 2013; 19: 2572–2583