

สัญญาเลขที่ MRG5180008

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาการแสดงออกของ survivin, c-erbB-2 และ c-kit ในมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

ผศ.พญ.กรกนก สุขพันธ์
รศ.พญ.จกกลณี เศรษฐกร
ผศ.นพ.ฉลอง ชิวเกரியงไกร
ศ.นพ.จตุพล ศรีสมบูรณ์
รศ.นพ.สุรพันธ์ คุณอมรพงศ์
รศ.พญ.สุมาลี ศิริอังกุล

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้รับทุนขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่สนับสนุนงบประมาณในโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่สนับสนุนด้านครุภัณฑ์ สถานที่ และบุคลากร ขอขอบคุณบุคลากรหลายท่านในภาควิชาพยาธิวิทยา และ ภาควิชาสัตวศาสตร์ไร่เวฬุวิทยา ที่อุทิศเวลาและแรงกายเพื่อโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณอาจารย์ที่ปรึกษาทุกท่าน ที่อุทิศเวลาให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในโครงการวิจัยนี้ และท้ายที่สุดขอขอบคุณผู้ปวยทุกท่านที่ผู้รับทุนนำตัวอย่างเนื้อเยื่อของท่านมาทำการศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญ

	หน้า
- กิตติกรรมประกาศ	3
- บทคัดย่อ	5-6
- Abstract	7-8
- Executive summary	9-15
- เนื้อหางานวิจัย	16-51
○ บทนำ	16-19
○ วิธีการทดลอง	20-24
○ ผลการทดลอง	25-42
○ บทวิจารณ์	44-47
○ เอกสารอ้างอิง	48-52
- Output	53-54
- ภาคผนวก	55

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG518008

ชื่อโครงการ : โครงการ การศึกษาการแสดงออกของ survivin, c-erbB-2 และ c-kit ในมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

ชื่อนักวิจัย : ผศ.พญ.กรรณก สุขพันธ์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : kosukpan@mail.med.cmu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี (15 พฤษภาคม 2551 ถึง 14 พฤษภาคม 2553)

มีโปรตีนหลายชนิดที่เกี่ยวข้องในขบวนการเกิดมะเร็งรวมทั้งโปรตีน 3 ชนิด คือ survivin, c-erbB-2 และ c-kit ซึ่งเป็นโปรตีนที่มียารักษาแบบมุ่งเป้าแล้ว

จุดประสงค์ของการศึกษานี้คือ 1) เพื่อศึกษาสัดส่วนของมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ในประชากรไทย ที่มีการแสดงออกของ survivin, c-erbB-2 และ c-kit, 2) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ survivin, c-erbB-2, c-kit และ ปัจจัยที่ใช้พยากรณ์โรคอื่นๆ ในมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma 3) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ survivin, c-erbB-2, c-kit และ อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

ได้ทำการศึกษา survivin, c-erbB-2 และ c-kit expression โดยวิธี immunohistochemistry ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma มีสัดส่วนของ case ที่ positive protein expression ดังต่อไปนี้ survivin; 4%(nuclear), 22.67%(Cytoplasmic), และ 26.67%(nuclear or cytoplasmic):c-kit; 9.33%(cytoplasmic), 5.33%(membrane) และ c-erbB-2; 0%

ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ disease recurrence ในทุกระยะของโรค (all stage) ได้แก่ lymph node metastasis($p=0.006$), depth of invasion($p=0.045$) และระยะของโรค ($p=0.042$) ส่วนในระยะต้นของโรค (early stage) ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ Disease recurrence ได้แก่ lymph node metastasis($p=0.005$) และ depth of invasion($p=0.044$)

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติมแบบ multivariate analysis ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ Disease recurrence ในทุกระยะของโรค (all stage) อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ stage ($p<0.0001$) ส่วน Protein expression ที่ศึกษา ไม่มีความสัมพันธ์กับ disease recurrence เลย

พบเพียง 1 ปัจจัยที่สัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิต disease free survival ได้แก่ lymph node metastasis ทั้งใน early stage และ all stage อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.0001$) ส่วน Protein expression ที่ศึกษา ไม่มีความสัมพันธ์กับ disease free survival เลย

สรุปว่าถึงแม้จะพบว่ามี การแสดงออกของ survivin, c-kit และ c-erbB-2 ในสัดส่วนที่น้อย แต่ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ซึ่งมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีและหากไม่ตอบสนองต่อการรักษามาตรฐานอาจจะได้รับประโยชน์จากการรักษาด้วย targeted therapy โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มี positive c-kit expression น่าจะมีโอกาสที่จะได้รับการรักษาด้วย tyrosine kinase inhibitor (Gleevec, imatinib mesylate)

การศึกษา protein expression ชนิดอื่นเช่น COX-2 ใน cervical small cell carcinoma metastatic lymph node ที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งและการกระจายของมะเร็ง นำไปสู่องค์ความรู้ที่กว้างขวางและใหม่ยิ่งขึ้น ในแง่ของกลไกการเกิดมะเร็ง ซึ่งแน่นอนว่าความรู้เหล่านี้จะนำไปสู่การคิดค้นมาตรการใหม่ๆ ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง

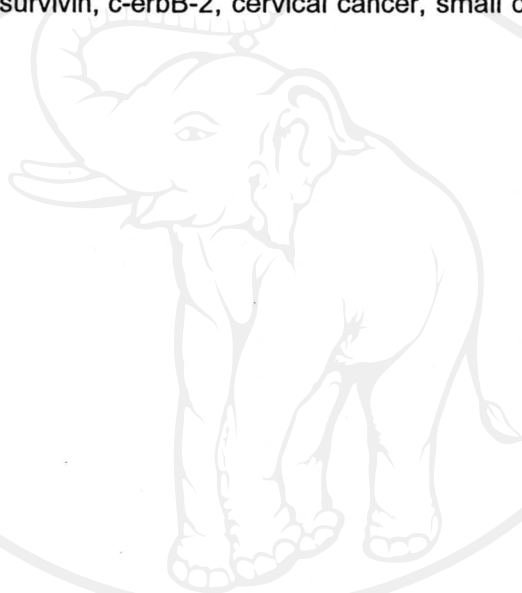
คำหลัก : COX-2, survivin, c-erbB-2, มะเร็งปากมดลูก, small cell carcinoma

Disease free survival was significantly associated with lymph node metastasis ($p < 0.0001$). No significant association between the studied protein expression and disease free survival.

Targeted therapy to these proteins could be applied in a proportion of small cell carcinoma cases, especially patient with positive c-kit expression.

Further studies of various protein expressions such as COX-2 in cervical small cell carcinoma would certainly provide novel understanding in cervical cancer carcinogenesis, leading to new cancer prevention and treatment strategies.

Keywords: COX-2, survivin, c-erbB-2, cervical cancer, small cell carcinoma



CHIANG MAI UNIVERSITY 1964

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Executive summary

Executive summary: บทนำ

มะเร็งปากมดลูก: ในปัจจุบัน อุบัติการณ์ของ และ อัตราตายจากมะเร็งปากมดลูกลดลงมาก เมื่อเทียบกับในอดีต จากการคัดกรอง (pap smear) และโครงการรณรงค์ รวมทั้งแนวทางการรักษา ยา เทคนิคการผ่าตัดและ การฉายรังสี ที่มีประสิทธิภาพ แต่มะเร็งปากมดลูกยังคงเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับหนึ่งของสตรีทั่วโลกรวมทั้งสตรีไทย ร้อยละ 80 ของมะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับมะเร็งชนิดนี้เป็นจำนวนมากทั้งทางด้านกลไกการเกิดโรค จนถึงการศึกษาค้นคว้าใหม่ ๆ ทำให้การรักษา มะเร็งปากมดลูกชนิด squamous cell carcinoma มีแนวทางที่ชัดเจน และอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยเพิ่มขึ้นจากในอดีต

มะเร็งปากมดลูกชนิด neuroendocrine carcinoma เป็นมะเร็งที่พบได้ไม่บ่อย มีความถี่อยู่ที่ร้อยละ 5 ของมะเร็งปากมดลูกทั้งหมด ความสำคัญทางคลินิกของมะเร็งชนิดนี้อยู่ที่ว่า ยังไม่เคยมีการระบุว่าพบ precancerous lesion ของ cervical neuroendocrine carcinoma ดังนั้น ขณะที่วินิจฉัยโรค ผู้ป่วยจึงเป็น invasive carcinoma แล้ว และมากกว่าครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยอยู่ใน stage II (หรือมากกว่า) มีการพยากรณ์โรคแย่มาก (ในทุกระยะ) มีอัตราการรอดชีวิตต่ำ ไม่สามารถพยากรณ์โรคได้ และยังไม่มียวิธีรักษาที่ได้ผลดี

Survivin เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม 'inhibitor of apoptosis protein' มีคุณสมบัติคือยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ โดยผ่านขบวนการ caspase dependent และ caspase independent ในอดีตเชื่อกันว่า survivin มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นเป้าหมายของ anticancer target therapy เนื่องจากตรวจไม่พบ survivin ในเซลล์ปกติของมนุษย์ และมีการตรวจพบการแสดงออกของ survivin (survivin expression) ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด โดยการศึกษาบ่งชี้ว่า survivin expression แปรผกผันกับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย และสามารถนำมาใช้เป็นปัจจัยในการพยากรณ์โรคที่แย่ (poor prognostic factor) ได้

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ survivin expression กับการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด squamous cell carcinoma พบว่า survivin expression มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ tumor progression, histologic grade, และ clinical stage

ในปัจจุบัน มีรายงานของ survivin expression ระดับต่ำๆ ในเซลล์ปกติของมนุษย์หลายชนิด เช่น T-lymphocytes, stem cells, neutrophils, megakaryocytes, endothelial cells, hepatocytes, gastrointestinal tract mucosal epithelial cells, neurons, endometrium, cervical mucosa cells, oocytes, และ spermatocytes เป็นต้น แต่ทั้งนี้การพัฒนายาต้านมะเร็ง antisurvivin target therapy ก็ยังคงดำเนินต่อไป เนื่องจากยังไม่เคยมีการการศึกษา survivin

expression ในมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma มาก่อน จึงมีความหวังว่า survivin expression อาจจะสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งชนิดนี้ได้ และยิ่งไปกว่านั้น หากพบ survivin expression ในมะเร็งชนิดนี้ จะทำให้มีความหวังในการนำ antisurvivin target treatment มาใช้รักษาผู้ป่วย ในอนาคต

C-erbB-2 (HER-2/neu) หรือ epidermal growth factor receptor 2 เป็นโปรตีนที่ควบคุมการสร้างโดย oncogene โปรตีนนี้อยู่ในกลุ่ม tyrosine kinase receptor family และในปัจจุบันได้รับการยอมรับกันว่าในมาตรฐานการดูแลรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จะต้องตรวจ expression ของ c-erbB-2 ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม เนื่องจาก ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี high expression ของ c-erbB-2 จะมีการพยากรณ์โรคที่แย่และมีการลุกลามของมะเร็งอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี high c-erbB-2 expression จะมีการตอบสนองที่ดีต่อการรักษาเมื่อได้รับ target therapy (anti c-erbB-2, trastuzumab, Herceptin) ร่วมกับยาเคมีบำบัด ในการศึกษามะเร็งปากมดลูกชนิด small and large cell neuroendocrine carcinoma จำนวน 24 รายในต่างประเทศ พบว่า 41.7% ของมะเร็งมี expression ของ c-erbB-2 และพบความสัมพันธ์ระหว่าง no c-erbB-2 expression และ short survival ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า Herceptin อาจจะช่วยผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ในประเทศไทยมีการตอบสนองต่อการรักษาที่ดีขึ้น หากพบ expression ของ c-erbB-2 ในเซลล์มะเร็ง

c-kit: c-kit proto-oncogene ควบคุมการสร้าง transmembrane tyrosinase receptor ที่ชื่อว่า CD117 เนื่องจากตรวจพบ expression ของโปรตีนชนิดนี้ในแทบทุกรายของเนื้องอกชนิด gastrointestinal stromal tumor จึงได้มีการพัฒนา target therapy (anti CD117, Gleevec, imatinib mesylate) ซึ่งในปัจจุบันถือว่าการรักษาที่ป้องกันการเกิดซ้ำและการกระจายของโรคหลังผ่าตัดที่ได้ผลดีที่สุด ในการศึกษามะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma จำนวน 21 รายในต่างประเทศ พบว่า 43% ของมะเร็งมี expression ของ c-kit ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า imatinib mesylate อาจจะช่วยผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ในประเทศไทยมีการตอบสนองต่อการรักษาที่ดีขึ้น หากพบ expression ของ c-kit ในเซลล์มะเร็ง

Executive summary: วัตถุประสงค์การทดลอง

- วัตถุประสงค์หลัก

- เพื่อศึกษาสัดส่วนของมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ในประชากรไทย ที่มีการแสดงออกของ survivin, c-erbB-2 และ c-kit

- วัตถุประสงค์รอง

- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ survivin, c-erbB-2, c-kit และ ปัจจัยที่ใช้พยากรณ์โรคอื่นๆ ในมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma
- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ survivin, c-erbB-2, c-kit และ อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

Executive summary: วิธีการทดลอง

Study design: Retrospective cross sectional study

Case detection: สืบค้นหา case จาก pathology report file ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Case confirmation:

ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด Small cell ทุกรายได้รับการวินิจฉัยและรายงานผลโดยพยาธิแพทย์ที่เชี่ยวชาญด้านพยาธิวิทยานรีเวช และ ทุกรายได้รับการ review histological slide โดยพยาธิแพทย์ที่เชี่ยวชาญด้านพยาธิวิทยานรีเวช และ ย้อมติด immunohistochemical markers (NSE, chromogranin A, synaptophysin, CD56) อย่างน้อย 2 ชนิด

Samples: ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัย ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างปี 2538-2551 และยังมี paraffin blocks เหลืออยู่ ซึ่งจำนวนผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกทั้งหมดที่นำมาศึกษา คือ 75 ราย มากกว่าจำนวนผู้ป่วยที่คำนวณได้จาก sample size calculation (50 ราย)

Variables: ข้อมูลทั่วไปที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ อายุ, severity of lesion ส่วนข้อมูลสำหรับ SCCA ที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ clinical stage, tumor size, histologic grade, depth of stromal invasion, lymphovascular space invasion, parametrial status, lymph node metastasis, c-kit expression, c-erbB-2 expression, expression, treatment, และ disease recurrence (Protein expression: positive or negative expression ประเมินจากวิธี immunohistochemistry)

Executive summary: ผลการทดลอง

ผลการทดลองส่วนที่ 1: การแสดงออกของ survivin, c-erbB-2 และ c-kit และความสัมพันธ์ระหว่าง protein expression และ clinico-pathologic parameter ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma มีสัดส่วนของ case ที่ positive protein expression ดังต่อไปนี้ survivin; 4%(nuclear), 22.67%(Cytoplasmic), และ 26.67%(nuclear or cytoplasmic):c-kit; 9.33%(cytoplasmic), 5.33%(membrane) และ c-erbB-2; 0% และตรวจพบ HPV genotype 82.67% โดยพบเป็น type 18 มากที่สุด 70.97%

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ survivin expression (survivin positive) และ กลุ่มที่ไม่พบ survivin expression (survivin negative) ในระยะต้นของโรค (early stage) พบว่า กลุ่มที่ survivin positive พบผู้ป่วยที่มีอายุน้อย (≤ 40) ได้มากกว่ากลุ่มที่ survivin negative ทั้งใน early stage และ all stages อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.004$)

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ c-kit expression (c-kit positive) และ กลุ่มที่ไม่พบ c-kit expression (c-kit negative) ในทุกระยะของโรค พบว่ากลุ่มที่ c-kit positive เป็นผู้ป่วย ในระยะต้น (Stage \leq IIA) (7/7, 100.00%) มากกว่ากลุ่มที่ c-kit negative (40/66, 60.61%) อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.046$)

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ lymph node metastasis (LN positive) และ กลุ่มที่ไม่พบ lymph node metastasis (LN negative) พบว่ากลุ่มที่ LN positive ผู้ป่วยมี parametrial involvement มากกว่ากลุ่มที่ LN negative ทั้งใน early stage และ all stages อย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.014$ และ $p=0.012$ ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ LN positive ผู้ป่วยมี disease recurrence มากกว่ากลุ่มที่ LN negative ทั้งใน early stage และ all stages อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.019$ และ $p=0.026$ ตามลำดับ)

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ disease recurrence (recur positive) และ กลุ่มที่ไม่พบ disease recurrence (recur negative) พบว่ากลุ่มที่ recur positive ผู้ป่วยมี depth of invasion มากกว่ากลุ่มที่ recur negative ทั้งใน early stage และ all stages อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p=0.028$ และ $p=0.025$ ตามลำดับ) และกลุ่มที่ recur positive ผู้ป่วยมี lymph node metastasis มากกว่ากลุ่มที่ recur negative ทั้งใน early stage และ all stages อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p=0.019$ และ $p=0.026$ ตามลำดับ)

ผลการทดลองส่วนที่ 2: ความสัมพันธ์ระหว่าง protein expression, clinico-pathologic parameters กับ disease recurrence ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

ปัจจัยที่สัมพันธ์กับdisease recurrence ในทุกระยะของโรค (all stage) ได้แก่ lymph node metastasis($p=0.006$), depth of invasion($p=0.045$) และระยะของโรค ($p=0.042$) ส่วนในระยะ ต้นของโรค (early stage) ปัจจัยที่สัมพันธ์กับDisease recurrence ได้แก่ lymph node metastasis($p=0.005$) และ depth of invasion($p=0.044$)

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติมแบบ multivariate analysis ปัจจัยที่สัมพันธ์กับDisease recurrence ในทุกระยะของโรค (all stage) อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ stage ($p<0.0001$) และ ปัจจัย ที่สัมพันธ์กับDisease recurrence ใน early stageอย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ HPV 18 ($p<0.0001$)

Protein expression ที่ศึกษา ไม่มีความสัมพันธ์กับ disease recurrence เลย

ผลการทดลองส่วนที่ 3: ความสัมพันธ์ระหว่าง protein expression, clinico-pathologic parameter กับ disease free survival ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma
จาก multivariate analysis พบเพียง 1 ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ disease free survival ได้แก่ lymph node metastasis ทั้งใน early stage และ all stage อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$)
Protein expression ที่ศึกษา ไม่มีความสัมพันธ์กับ disease free survival เลย

Executive summary: บทวิจารณ์

บทวิจารณ์ส่วนที่ 1: การแสดงออกของ survivin, c-erbB-2 และ c-kit และความสัมพัทธ์ระหว่าง protein expression และ clinico-pathologic parameter ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

1.1 การแสดงออกของ survivin ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma พบน้อย กล่าวคือพบ nuclear expression 4%(3/75), cytoplasmic expression 22.67%(17/75) และมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับอายุของผู้ป่วย ($p = 0.004$, negative correlation) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับ clinico-pathologic parameter หรือ protein expression อื่น

เนื่องจากผลการทดลองที่พบว่ามี survivin expression ใน cervical small cell carcinoma น้อยมาก การใช้ survivin เป็น target therapy จึงมีโอกาสน้อย

1.2 การแสดงออกของ c-kit ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma การศึกษานี้พบ c-kit expression 9.33% น้อยกว่าการศึกษาของ Wang HL, et al 27.27% และ Ohwada M, et al 42.86%

นอกจากนี้การศึกษานี้ยังพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่าง c-kit expression กับ stage ($p = 0.046$, positive correlation) แตกต่างจากการศึกษาของ Wang HL, et al ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว แต่การศึกษาทั้งสองได้ผลเช่นเดียวกันว่า c-kit expression ไม่สัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วยและการพยากรณ์โรค

ถึงแม้ว่าจะพบ c-kit expression น้อยแต่ผู้ป่วยที่มี positive c-kit expression น่าจะมีโอกาสที่จะได้รับการรักษาด้วย tyrosine kinase inhibitor (Gleevec, imatinib mesylate) ซึ่งได้ผลดีในการรักษา gastrointestinal stromal tumor แต่ในขณะนี้ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการรักษา cervical small cell carcinoma ด้วยยาดังกล่าวและต้องอาศัยการศึกษาต่อไป

1.3 การแสดงออกของ c-erbB-2 ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma การศึกษานี้ไม่พบ c-erbB-2 expression คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Straughn JM, et al 0%(0/16) แต่แตกต่างจากการศึกษาของ Tangjitkamol S, et al ซึ่ง พบ c-erbB-2 expression สูงถึง 41.7%(10/24)

1.4 เมื่อทำการทดสอบความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆที่ศึกษา พบว่า

- Lymph node metastasis มีความสัมพันธ์กับ parametrial involvement และ disease recurrence (P=0.012, positive correlation)
- Parametrial involvement มีความสัมพันธ์กับ ขนาดของมะเร็ง (size) และ lymph node metastasis
- Lymphovascular space invasion มีความสัมพันธ์กับขนาดของมะเร็ง depth of invasion และ HPV type 18
- Depth of invasion มีความสัมพันธ์กับขนาดของมะเร็งและการกลับเป็นโรครุนซ้ำ
- ระยะของโรคมีความสัมพันธ์กับ c-kit expression
- HPV type 16, ตำแหน่งของการกลับเป็นโรครุนซ้ำ (site of recurrence) ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับปัจจัยใดเลย

บทวิจารณ์ส่วนที่ 2 และ 3: ความสัมพันธ์ระหว่าง protein expression, clinico-pathologic parameter กับ disease recurrence และ disease free survival ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

การศึกษานี้พบปัจจัยที่สัมพันธ์กับDisease recurrence ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ได้แก่ lymph node metastasis, depth of invasion และระยะของโรค (FIGO stage) ส่วน Protein expression ที่ศึกษา ไม่มีความสัมพันธ์กับ disease recurrence เลย

ปัจจัยที่สัมพันธ์กับdisease free survival พบเพียง 1 ปัจจัยได้แก่ lymph node metastasis ทั้งในearly stage และ all stage อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.0001) ส่วน Protein expression ที่ศึกษา ไม่มีความสัมพันธ์กับ disease free survival เลย

รายงานเกี่ยวกับ cervical small cell carcinoma ที่ผ่านมา ระบุว่าปัจจัยที่สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ได้แก่ large tumor size, lymph node metastasis, smoking, stage, deep stromal invasion (49)

มีรายงานว่า c-erbB-2 expression มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ disease free survival โดยพบว่าผู้ป่วยที่มี negative c-erbB-2 expression มี survival สั้นกว่าผู้ป่วยที่มี positive c-erbB-2 expression ส่วน c-kit expression ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ survival

Executive summary: สรุป

1. cervical small cell carcinoma มีการแสดงออกของ survivin, c—kit และ c-erbB-2 ในสัดส่วนที่น้อย

2. ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ซึ่งมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีและหากไม่ตอบสนองต่อการรักษามาตรฐานอาจจะได้รับประโยชน์จากการรักษาด้วย targeted therapy โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มี positive c-kit expression น่าจะมีโอกาสที่จะได้รับการรักษาด้วย tyrosine kinase inhibitor (Gleevec, imatinib mesylate) ซึ่งได้ผลดีในการรักษา gastrointestinal stromal tumor

Executive summary: ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

การศึกษา protein expression ชนิดอื่นเช่น COX-2 ใน cervical small cell carcinoma metastatic lymph node ที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งและการกระจายของมะเร็ง นำไปสู่องค์ความรู้ที่กว้างขวางและใหม่ยิ่งขึ้น ในแง่ของกลไกการเกิดมะเร็ง ซึ่งแน่นอนว่าความรู้เหล่านี้จะนำไปสู่การคิดค้นมาตรการใหม่ๆ ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง

มะเร็งปากมดลูกชนิด Small cell carcinoma

ในปัจจุบัน อุบัติการณ์ของ และ อัตราตายจากมะเร็งปากมดลูกลดลงมากเมื่อเทียบกับในอดีต (3) จากการคัดกรอง (pap smear) และโครงการรณรงค์ รวมทั้งแนวทางการรักษา ยา เทคนิค การผ่าตัดและ การฉายรังสี ที่มีประสิทธิภาพ แต่มะเร็งปากมดลูกยังคงเป็นมะเร็งที่พบบ่อยเป็นอันดับหนึ่งของสตรีทั่วโลกรวมทั้งสตรีไทย (4, 5) จากสถิติของหน่วยมะเร็งนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่ามีผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกรายใหม่ที่ได้รับการวินิจฉัยที่โรงพยาบาลมหาราชนิกมากถึงปีละ 500 ราย

ร้อยละ 80 ของมะเร็งปากมดลูก เป็นมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma (6) ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับมะเร็งชนิดนี้เป็นจำนวนมากทั้งทางด้านกลไกการเกิดโรค จนถึงการศึกษา ค้นคว้าใหม่ ๆ ทำให้การรักษามะเร็งปากมดลูกชนิด squamous cell carcinoma มีแนวทางที่ชัดเจน และอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยเพิ่มขึ้นจากในอดีต (7)

มะเร็งปากมดลูกชนิด neuroendocrine carcinoma เป็นมะเร็งที่พบได้ไม่บ่อย มีความถี่อยู่ที่ร้อยละ 5 ของมะเร็งปากมดลูกทั้งหมด (8) ความสำคัญทางคลินิกของมะเร็งชนิดนี้อยู่ที่ว่า

1. ยังไม่เคยมีการระบุว่าพบ precancerous lesion ของ cervical neuroendocrine carcinoma (9) ดังนั้น ขณะที่วินิจฉัยโรค ผู้ป่วยจึงเป็น invasive carcinoma แล้ว และมากกว่าครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยอยู่ใน stage II (หรือมากกว่า) (10)

2. มีการพยากรณ์โรคแย่มาก (ในทุกระยะ) มีอัตราการรอดชีวิตต่ำ ไม่สามารถพยากรณ์โรคได้ และยังไม่มียาที่รักษาที่ได้ผลดี (9, 11) ซึ่งจากการศึกษาของต่างประเทศพบว่า มะเร็งชนิดนี้

- มี median survival rate ประมาณ 22 เดือน (10)

- ร้อยละ 78 ของผู้ป่วยมีมะเร็งกระจายไปที่ต่อมน้ำเหลืองตั้งแต่ตอนที่วินิจฉัยโรคครั้งแรก (12)

- อัตราการรอดชีวิตที่ 2 ปี มีเพียงร้อยละ 38 (12) ซึ่งน้อยมากเมื่อเทียบกับอัตราการรอดชีวิตที่ 5 ปี (ร้อยละ 40-90) ของมะเร็งปากมดลูกชนิด squamous cell carcinoma (13)

Survivin

Survivin เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม 'inhibitor of apoptosis protein' มีคุณสมบัติคือยับยั้งการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ โดยผ่านขบวนการ caspase dependent และ caspase

independent ในอดีตเชื่อกันว่า survivin มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นเป้าหมายของ anticancer target therapy เนื่องจากตรวจไม่พบ survivin ในเซลล์ปกติของมนุษย์ และมีการตรวจพบการแสดงออกของ survivin (survivin expression) ในเซลล์มะเร็งหลายชนิด (14, 15) เช่น มะเร็งหลอดอาหาร (16) มะเร็งปอดชนิด non-small cell carcinoma (17) มะเร็งรังไข่ (18) มะเร็งสมอง (19), มะเร็งเต้านม (20, 21) มะเร็งลำไส้และกระเพาะอาหาร (19) มะเร็งผิวหนังชนิด melanoma (22) มะเร็งของเนื้อเยื่ออ่อนและกระดูก (sarcoma) (23) มะเร็งช่องปากและลำคอ (24) มะเร็งตับอ่อน (25) มะเร็งปากมดลูกชนิด squamous cell carcinoma (25), มะเร็งเยื่อโพรงมดลูก (26) มะเร็งตับ (27) และ มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (28) โดยการศึกษาเหล่านี้บ่งชี้ว่า survivin expression แปรผกผันกับอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วย และสามารถนำมาใช้เป็นปัจจัยในการพยากรณ์โรคที่แย่ (poor prognostic factor) ได้

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ survivin expression กับการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด squamous cell carcinoma พบว่า survivin expression มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ tumor progression, histologic grade, และ clinical stage (29-31)

ในปัจจุบัน มีรายงานของ survivin expression ระดับต่ำๆ ในเซลล์ปกติของมนุษย์หลายชนิด (14) เช่น T-lymphocytes, stem cells, neutrophils, megakaryocytes, endothelial cells, hepatocytes, gastrointestinal tract mucosal epithelial cells, neurons, endometrium, cervical mucosa cells, oocytes, และ spermatocytes เป็นต้น แต่ทั้งนี้การพัฒนายาต้านมะเร็ง antisurvivin target therapy ก็ยังคงดำเนินต่อไป เนื่องจากการทดลองในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นมะเร็งชนิดต่างๆ เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งสมอง มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งลำไส้ใหญ่ และ มะเร็งของกล้ามเนื้อลาย และใช้ antisurvivin treatment ชนิดต่างๆ ทั้งการฉีด antisurvivin (T34A using adenovirus, inhibition of T34 survivin by flavopiridol, siRNA for survivin using adenovirus, C84A survivin plasmid plus tumor specific CTL, และ shRNA for survivin) ลงไปในก้อนเนื้องอก และ การฉีด peptide blocking survivin and heat shock protein 90 interaction เข้าหลอดเลือด พบว่ามีการตอบสนองของเซลล์มะเร็งต่อการรักษาอย่างชัดเจน (มะเร็งมีขนาดเล็กลง 40-70%, ลดการกระจายของมะเร็ง, สัตว์ทดลองมีชีวิตรอดนานขึ้น, พบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งจำนวนมาก, ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดในเซลล์มะเร็ง) และไม่พบผลข้างเคียงจากการใช้ antisurvivin treatment ในสัตว์ทดลอง (32-41)

เนื่องจากยังไม่เคยมีการการศึกษา survivin expression ในมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma มาก่อน จึงมีความหวังว่า survivin expression อาจจะสามารถนำมาใช้ในการพยากรณ์โรคของผู้ป่วยมะเร็งชนิดนี้ได้ และยิ่งไปกว่านั้นหากพบ survivin expression ในมะเร็งชนิดนี้ จะทำให้มีความหวังในการนำ antisurvivin target treatment มาใช้รักษาผู้ป่วยในอนาคต

C-erbB-2

c-erbB-2 (HER-2/neu) หรือ epidermal growth factor receptor 2 เป็นโปรตีนที่ควบคุมการสร้างโดย oncogene โปรตีนนี้อยู่ในกลุ่ม tyrosine kinase receptor family และในปัจจุบันได้รับการยอมรับกันว่าในมาตรฐานการดูแลรักษาผู้ป่วยมะเร็งเต้านม จะต้องตรวจ expression ของ c-erbB-2 ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม เนื่องจาก ผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี high expression ของ c-erbB-2 จะมีการพยากรณ์โรคที่แย่มากและมีการลุกลามของมะเร็งอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่มี high c-erbB-2 expression จะมีการตอบสนองที่ดีต่อการรักษาเมื่อได้รับ target therapy (anti c-erbB-2, trastuzumab, Herceptin) ร่วมกับยาเคมีบำบัด (42) ในการศึกษา มะเร็งปากมดลูกชนิด small and large cell neuroendocrine carcinoma จำนวน 24 รายในต่างประเทศ พบว่า 41.7% ของมะเร็งมี expression ของ c-erbB-2 และพบความสัมพันธ์ระหว่าง no c-erbB-2 expression และ short survival (2) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า Herceptin อาจจะช่วยผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ในประเทศไทยมีการตอบสนองต่อการรักษาที่ดีขึ้น หากพบ expression ของ c-erbB-2 ในเซลล์มะเร็ง

C-kit

c-kit proto-oncogene ควบคุมการสร้าง transmembrane tyrosinase receptor ที่ชื่อว่า CD117 เนื่องจากตรวจพบ expression ของโปรตีนชนิดนี้ในแทบทุกรายของเนื้องอกชนิด gastrointestinal stromal tumor จึงได้มีการพัฒนา target therapy (anti CD117, Gleevec, imatinib mesylate) ซึ่งในปัจจุบันถือว่าการรักษาที่ป้องกันการเกิดซ้ำและการกระจายของโรคหลังผ่าตัดที่ได้ผลดีที่สุด (43) ในการศึกษา มะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma จำนวน 21 รายในต่างประเทศ พบว่า 43% ของมะเร็งมี expression ของ c-kit (1) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า imatinib mesylate อาจจะช่วยผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ในประเทศไทยมีการตอบสนองต่อการรักษาที่ดีขึ้น หากพบ expression ของ c-kit ในเซลล์มะเร็ง

วัตถุประสงค์การทดลอง

วัตถุประสงค์

- วัตถุประสงค์หลัก

- เพื่อศึกษาสัดส่วนของมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ในประชากรไทย ที่มีการแสดงออกของ survivin, c-erbB-2 และ c-kit

- วัตถุประสงค์รอง

- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ survivin, c-erbB-2, c-kit และ ปัจจัยที่ใช้พยากรณ์โรคอื่นๆ ในมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของ survivin, c-erbB-2, c-kit และ อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

สมมติฐานการทดลอง

1. The expression of survivin, c-erbB-2, and c-kit are correlated with the conventional prognostic parameters and the disease recurrence in small cell carcinoma of uterine cervix
2. Using these molecules, it is able to build the prognostic model of cervical cancer.
3. Using these molecules, it is able to classify cervical cancer cases to provide the suitable treatment protocol.

เนื้อหางานวิจัย –วิธีการทดลอง

Study design: Retrospective cross sectional study

Case detection: สืบค้นหา case จาก pathology report file ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Case confirmation:

ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ทุกรายได้รับการวินิจฉัยและรายงานผลโดยพยาธิแพทย์ที่เชี่ยวชาญด้านพยาธิวิทยานรีเวช และ ทุกรายได้รับการ review histological slide โดยพยาธิแพทย์ที่เชี่ยวชาญด้านพยาธิวิทยานรีเวช และย้อมติด immunohistochemical markers (NSE, chromogranin A, synaptophysin, CD56) อย่างน้อย 2 ชนิด

Samples: ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัย ณ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างปี 2538-2551 และยังมี paraffin blocks เหลืออยู่ ซึ่งจำนวนผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกทั้งหมดที่นำมาศึกษา คือ 75 ราย มากกว่าจำนวนผู้ป่วยที่คำนวณได้จาก sample size calculation (50 ราย)

ตารางที่ 1: ข้อมูลที่ศึกษาและวิธีเก็บข้อมูล

ข้อมูล	วิธีเก็บข้อมูล
ปีที่วินิจฉัย	สืบค้นจาก pathology report (2538-2551)
อายุ	สืบค้นจาก OPD card หรือ pathology report form หรือข้อมูลจากหน่วยมะเร็งนรีเวชวิทยา คณะแพทย์ฯ (หน่วย = ปี)
Clinical staging	ข้อมูลจากหน่วยมะเร็งนรีเวชวิทยา คณะแพทย์ฯ
Histologic parameters	Depth of invasion(inner/middle/outer third of cervical stroma) Lymphovascular invasion(positive/negative) Parametrial invasion(positive/negative) Lymph node metastasis(positive/negative)
Survivin expression	Immunohistochemistry - Nuclear expression - Negative: < 5% of tumor cells or weak intensity - Positive: >5 % of tumor cells and moderate-strong intensity - Cytoplasmic expression - Negative: < 5% of tumor cells or weak intensity - Positive: >5 % of tumor cells and moderate-strong intensity

c-erbB-2 expression	<p>Immunohistochemistry</p> <ul style="list-style-type: none"> - Membrane expression <ul style="list-style-type: none"> - Negative: < 5% of tumor cells or weak intensity - Positive: >5 % of tumor cells and moderate-strong intensity - Cytoplasmic expression <ul style="list-style-type: none"> - Negative: < 5% of tumor cells or weak intensity - Positive: >5 % of tumor cells and moderate-strong intensity
c-kit expression	<p>Immunohistochemistry</p> <ul style="list-style-type: none"> - Membrane expression <ul style="list-style-type: none"> - Negative: < 5% of tumor cells or weak intensity - Positive: >5 % of tumor cells and moderate-strong intensity - Cytoplasmic expression <ul style="list-style-type: none"> - Negative: < 5% of tumor cells or weak intensity - Positive: >5 % of tumor cells and moderate-strong intensity
การรักษาโรค	<p>ข้อมูลจากหน่วยมะเร็งนรีเวช รังสีรักษา และเวชระเบียน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Surgery 2. Radiation 3. Chemotherapy
การดำเนินโรค	<ol style="list-style-type: none"> 1. Alive without disease 2. Recurrence at month ____ 3. Metastasis at month ____ 4. Death from disease at month ____

IHC protocol using Dako Envision system and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue

- Three-micrometer tissue sections were mounted on positive charged slides.
- The sections were deparaffinized in xylene and sequentially washed in graded ethanol and finally in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4).
- Epitope retrieval was done (รายละเอียด ดังตารางที่ 2).
- Endogenous peroxidase activity was blocked by immersion of the slides in methanol with 0.3% hydrogenperoxide for 30 minutes.

- The slides were blocked with a solution of 3% normal horse serum in PBS for 10 minutes at room temperatures.
- The slides were incubated with the primary antibodies (รายละเอียด ดังตารางที่ 4)., 1 hour at room temperature.
- The slides were treated with anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase-labelled polymer (Dako, Envision) for 30 minutes, at room temperature.
- The slides were be incubated with 3-3'-diaminobenzidine for 10 minutes
- The slides were counterstained with hematoxylin, and coversliped.

Linear array HPV genotyping test

DNA extraction: Five paraffin-embedded sections, each of which was 5 µm thick, will be cut from each specimen. After deparaffinization in xylene and rehydration in ethanol, DNA will be extracted from the tissues using QIAamp Tissue kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. A final elution of 40 µl will be stored prior to the PCR reaction

HPV testing with L-1-consensus primers: All samples will be screened for the first PCR amplification with primers MY09 and MY11 located within HPV L1 gene. The amplified DNA samples will be re-amplified in nested PCR using primers GP5+ and GP6+. The first-step PCR of 25 µl total reaction, 3 µl of DNA solution will be used and 3 µl of the first PCR product will be used as template for the nested PCR. To determine that all samples originally contained amounts of cellular DNA, the samples will be co-amplified for the presence of an internal standard, beta globin. Amplification reaction will be performed with initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C (MY09/MY11, globin sense/antisense), 53°C (GP5⁺/GP6⁺) for 1 min, and extension at 72°C for 1 min, and with a final extension at 72°C for 5 min. The amplified products will be run on a 2% agarose gel and stained with ethidium bromide for size verification (fig. 1). The primer sequences are as follows:

MY09: 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3',

MY11: 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3',

(M =A or C, R = A or G, W = A or T, Y = C or T)

GP5+:5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3',

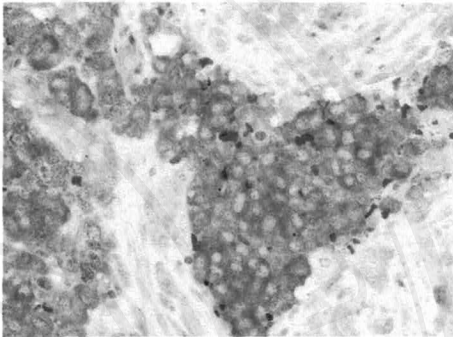
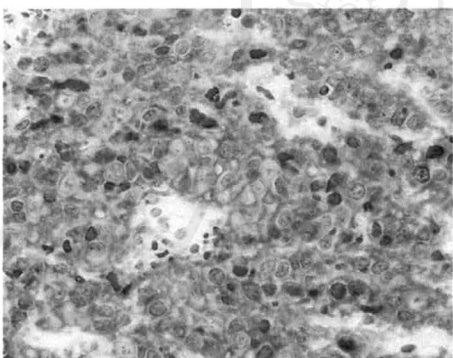
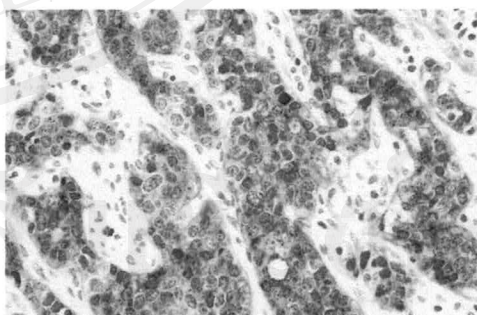
GP6+:5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATT-3',

Globin sense:5'-ACACAAGTGTGTTCACTAGC-3',

Globin antisense: 5'-TTCTCTGTCTCCACATGCCC-3'

HPV typing by LA HPV GT: The DNA in nested PCR will be analyzed by LA HPV GT involving three processes that included PCR amplification of target DNA, nucleic acid hybridization, and finally detection of up to 37 anogenital HPV genotypes. Briefly, PCR will be performed in a total volume of 100 μ l containing 50 μ l LA master mix and 50 μ l DNA. Amplification will be performed in a Perkin Elmer Gene Amp 9700. The program composed of 2 min at 50°C, and 9 min at 95°C, followed by 40 cycles of 30 s at 50°C, 1 min at 55°C, and 1 min at 72°C, with a final extension of 5 min at 72°C. The PCR products will be denatured with denaturing solution and hybridized on to the strip containing specific probes for 37 HPV genotypes and beta globin reference lines. Resulting from reaction of Streptavidin-horseradish peroxidase and substrate, positive reactions will show blue lines on the strip.

ตารางที่ 2 รายละเอียดการศึกษา expression ของ survivin, c-erbB-2, c-kit ใน cervical small cell carcinoma

Antibodies	Details	Positive cases
Survivin	<p><i>Company:</i> Neomarker</p> <p><i>Clone:</i> RB-9245</p> <p><i>Retrieval technique:</i> Microwave</p> <p><i>Dilution:</i> 1:100</p> <p><i>Positive control:</i> normal pancreas</p> <p><i>Positive staining:</i> \geq 5% of tumor cells, nuclear or cytoplasmic staining, moderate or strong intensity</p>	
c-erbB-2	<p><i>Company:</i> Dako cytomation</p> <p><i>Polyclonal Rabbit anti-human c-erbB-2(A0485)</i></p> <p><i>Retrieval technique:</i> Citrate buffer</p> <p><i>Dilution:</i> 1:800</p> <p><i>Positive control:</i> breast carcinoma</p> <p><i>Positive staining:</i> \geq 5% of tumor cells, membrane or cytoplasmic staining, moderate or strong intensity</p>	
c-kit	<p><i>Company:</i> Dako cytomation</p> <p><i>Polyclonal Rabbit anti-human c-kit</i></p> <p><i>Retrieval technique:</i> Citrate buffer</p> <p><i>Dilution:</i> 1:800</p> <p><i>Positive control:</i> Gastrointestinal stromal tumor</p> <p><i>Positive staining:</i> \geq 5% of tumor cells, membrane or cytoplasmic staining, moderate or strong intensity</p>	

IHC evaluation

สไลด์ที่ได้จากการย้อม IHC โดยใช้ antibodies ต่อ survivin, c-kit และ c-erbB-2 ได้ถูกนำมาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยพยาธิแพทย์ 2 คน แยกกันประเมินสไลด์ทั้งหมด การประเมินผล expression ของ protein ทั้ง 3 ชนิดในแต่ละราย ใช้ semiquantitative method คือ ประเมินสัดส่วนของ cells ที่สนใจ ที่มี immunoreactive ต่อ antibody ในระดับตั้งแต่ moderate intensity ขึ้นไป ว่ามีร้อยละเท่าใด ในรายที่ cells ที่สนใจ มี immunoreactivity (moderate to strong intensity) มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 5 จึงจะเรียกว่าให้ผล positive expression รายที่นอกเหนือจากนี้เรียกว่า negative

หลังจากนั้นจึงนำผลการประเมินของพยาธิแพทย์ทั้งสองคนมาเปรียบเทียบกัน สไลด์ของรายที่มีผลการประเมินไม่ตรงกัน ได้ถูกนำกลับมาดูใหม่พร้อมกันอีกครั้ง เพื่อให้ผลการประเมินสุดท้ายที่พ้องกัน (consensus)

เนื้อหางานวิจัย - ผลการทดลอง

ผลการทดลองส่วนที่ 1: การแสดงออกของ survivin, c-erbB-2 และ c-kit และความสัมพันธ์ระหว่าง protein expression และ clinico-pathologic parameter ในผู้ป่วยมะเร็งเรื้องปากลมดลูกชนิด small cell carcinoma

1.1 ลักษณะต่างๆของผู้ป่วยมะเร็งเรื้องปากลมดลูกทั้งหมด 75 ราย ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3: Characteristics of 75 small cell carcinoma cases

Characteristics	N (%)
Year of diagnosis	
- 2538	4(5.33)
- 2539	3(4.00)
- 2540	4(5.33)
- 2541	5(6.67)
- 2542	6(8.00)
- 2543	4(5.33)
- 2544	4(5.33)
- 2545	2(2.67)
- 2546	7(9.33)
- 2547	5(6.67)
- 2548	8(10.67)
- 2549	9(12.00)
- 2550	7(9.33)
- 2551	7(9.33)
Total	75(100.00)
Age in year (mean \pm SD)	43.04(9.51)
Median (range)	42(27-72)
Depth of the lesion	
- Inner third	14 (38.89)
- Middle third	5(13.89)
- Outer third	9(25.00)

- Entire wall	8(22.22)
Total	36 (100.00)
Clinical staging	
- IA1	3(4.11)
- IA2	3 (4.11)
- IB1	29 (39.73)
- IB2	11(15.07)
- II2	1(1.37)
- IIB	13(17.81)
- III1	2(2.74)
- III2	6(8.22)
- IV	5(6.85)
Total	73(100.00)
Lymph node metastasis	
- Negative	30 (85.71)
- Positive	5 (14.29)
Total	35(100.00)
Parametrial involvement	
- Negative	28 (82.35)
- Positive	6(17.65)
Total	32 (100.00)
Lymph-vascular space invasion	
- Negative	12 (32.43)
- Positive	25 (67.57)
Total	37(100.00)
Tumor size (mm.)	
Mean (SD)	23.08 (14.69)
Median (range)	20 (1-50)
Follow up time in month	
Mean (SD)	36.35(32.08)
Median (range)	23(2-144)

Disease recurrence	
- No recurrence	24(52.17)
- Recurrence	22(47.82)
(ranging from 1-50 months, median 10 months)	
Recurrence	
- Distance (metastasis)	15(68.18)
- Local recurrence	5(22.73)
- Both local and distance	2(9.09)
Treatment	
- Surgery	4(7.14)
- Surgery and chemotherapy/ radiotherapy	34(60.71)
- chemotherapy/ radiotherapy	18(32.14)

1.2 การแสดงออกของ survivin, c-erbB-2 และ c-kit

การแสดงออกของ survivin, c-kit และ c-erbB-2 ในมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4: การแสดงออกของ survivin, c-kit และ c-erbB-2 มะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

Protein expression	N (%)
Survivin expression(nuclear)	
- Positive	3(4.00)
- Negative	72(96.00)
Total	75(100)
Survivin expression(nuclear or cytoplasmic)	
- Positive	20(26.67)
- Negative	56(73.33)
Total	75(100)
Survivin expression(cytoplasmic)	
- Positive	17(22.67)
- Negative	58(77.33)



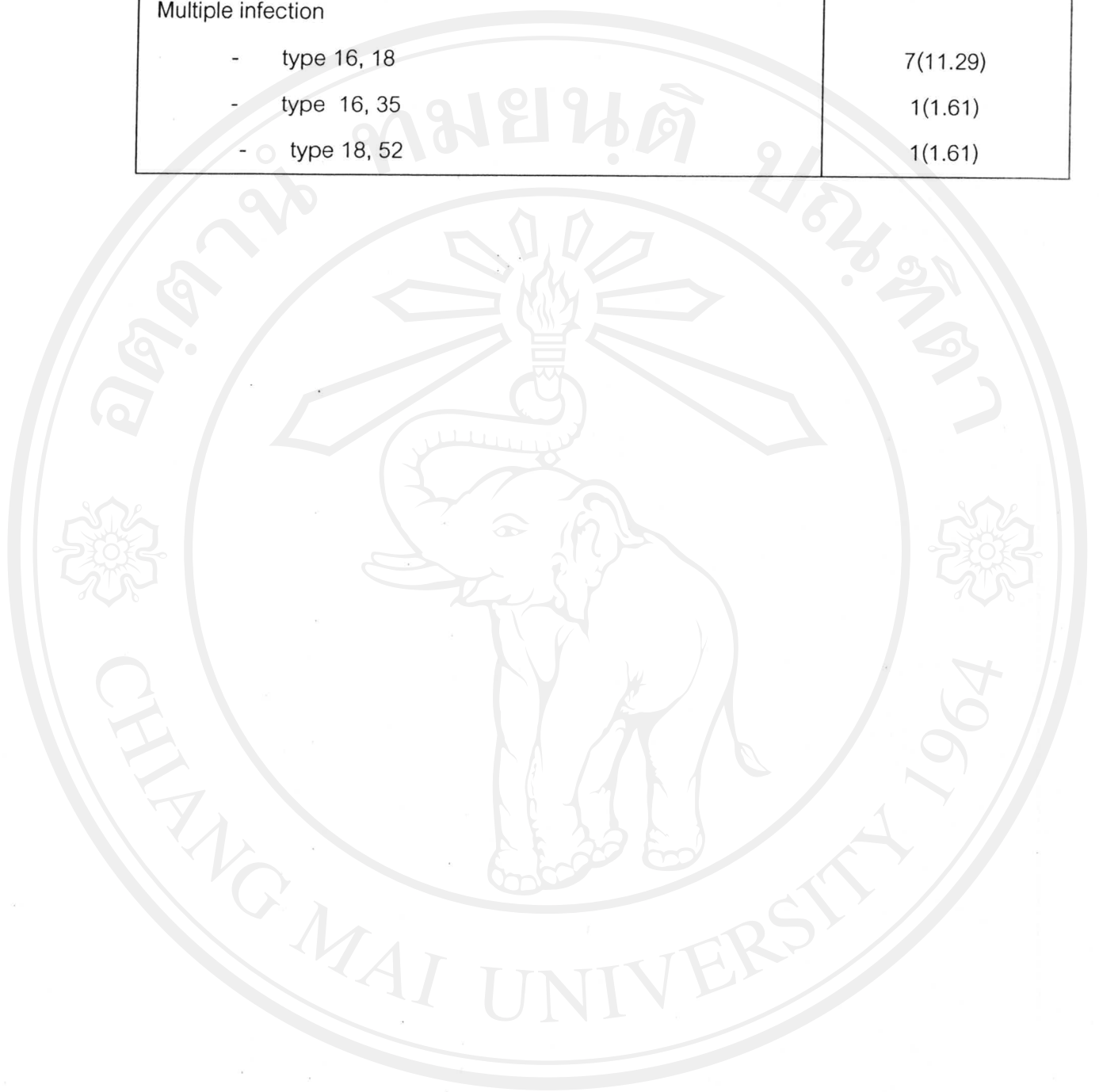
Total	75(100)
c-kit expression(cytoplasmic)	
- Positive	7(9.33)
- Negative	68(90.67)
Total	75(100)
c-kit expression(membrane)	
- Positive	4(5.33)
- Negative	71(94.67)
Total	75(100)
C-erb-B2 expression	
- Positive	0(0)
- Negative	75(100)
Total	75(100)

1.3 HPV genotype

HPV genotype ในมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma แสดงไว้ในตารางที่ 4
 ตารางที่ 5: แสดง HPV genotype ในมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

HPV GENOTYPE	N (%)
HPV genotype	
- Positive	62(82.67)
- Negative	3(4.00)
- Inadequate	10(13.33)
Total	75(100)
Single infection	
- type 16	7(11.29)
- type 18	44(70.97)
- type 58	1(1.61)
- unknown type	1(1.61)

Multiple infection	
- type 16, 18	7(11.29)
- type 16, 35	1(1.61)
- type 18, 52	1(1.61)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

1.4 ผลการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ ที่ศึกษา

ตารางที่ 6: P value of each correlation (t=t test, c=chi-square test, marked value = p<0.05, +=positive correlation, -=negative correlation

	LN	Para	LVI	Depth	Size	Stage	Survivin	C-kit	HPV	HPV type 16	HPV type 18	Site of recur	Death	recurrence
Age	1.000'	0.660'	0.414 ^c	0.790 ^c	0.3002'	0.238 ^c	0.004 ^c	0.037 ^c	0.269'	0.548 ^c	0.043 ^c	0.609'	1.000'	0.813 ^c
LN		0.1012 ⁺	0.141'	0.144'	0.0828'	1.000'	0.630'	1.000'	1.000'	0.604'	0.560'	0.236'	1.000'	0.026 ⁺
Para			0.069'	0.062'	0.0007 ⁺	1.000'	1.000'	0.580'	1.000'	0.642'	0.293'	0.491'	1.000'	0.363'
LVI				0.029 ⁺	0.0000 ⁺	1.000'	1.000'	1.000'	0.324'	1.000'	0.024 ⁺	1.000'	1.000'	0.064'
Depth					0.0031 ⁺	1.000'	0.311 ^c	0.681'	0.394'	0.263'	0.393'	1.000'	1.000'	0.025 ⁺
Size						-	0.6327'	0.4031'	-	0.8827'	0.0354'	0.1987'	-	0.1154'
Stage							0.123 ^c	0.046 ⁺	0.548'	0.342'	1.000'	1.000'	1.000'	0.061 ^c
Survivin								0.375f	0.555'	0.529'	0.091'	1.000'	1.000'	0.757 ^c
C-kit									1.000'	0.615'	0.159'	0.411'	1.000'	0.69
HPV										-	-	0.200'	1.000'	1.000'
HPV type 16											-	1.000'	0.370'	1.000'
HPV type 18												0.509f	0.370'	0.720'
Site of recur													-	-
Death													1.000'	-
recurrence														0.161'

Age in year (≤40 years vs >40 years)

LN= lymph node metastasis (negative vs positive)

Para= parametrial involvement (negative vs positive)

LVI= lymphovascular space invasion (negative vs positive)

Depth= depth of invasion (inner third vs more than inner third)

Size in mm

Stage= FIGO staging (≤IIa vs >IIa)

Survivin= survivin expression, nuclear and cytoplasmic staining (negative vs positive)

C-kit= c-kit expression, cytoplasmic staining (negative vs positive)

HPV= HPV infection, anytype (negative vs positive)

HPV type 16= HPV type 16 infection, anytype (negative vs positive)

HPV type 18= HPV type 18 infection, anytype (negative vs positive)

Site of recur= site of recurrence (local vs distance)

Death = dead of disease (alive or dead)

Recurrence= disease recurrence (no recurrence vs recurrence)

เมื่อทำการทดสอบความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆที่ศึกษาพบว่า

- อายุของผู้ป่วยมีความสัมพันธ์กับ survivin expression โดยผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 40 ปีมี survivin expression มากกว่าผู้ป่วยที่มีอายุมาก
- Lymph node metastasis มีความสัมพันธ์กับ parametrial involvement และการกลับเป็นโรคซ้ำ(disease recurrence)
- Parametrial involvement มีความสัมพันธ์กับ ขนาดของมะเร็ง (size)
- Lymphovascular space invasion มีความสัมพันธ์กับขนาดของมะเร็ง (size), depth of invasion และ HPV type 18
- Depth of invasion มีความสัมพันธ์กับขนาดของมะเร็ง (size) และการกลับเป็นโรคซ้ำ (disease recurrence)
- ระยะของโรคมีความสัมพันธ์กับ c-kit expression
- HPV type 16, ตำแหน่งของการกลับเป็นโรคซ้ำ(site of recurrence) ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับปัจจัยใดเลย

1.5. การเปรียบเทียบลักษณะต่างๆของมะเร็งกลุ่มที่มี negative protein expression และ positive protein expression ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7, 8, 9 และ 10

ตารางที่ 7: Correlation of survivin and other parameters in early stages (^t=t-test, ^c=chi-square test, ^f=Fisher' exact test)

Parameter	n (%)	n(%)	P value ^{test}
	Survivin -	Survivin +	
Age _≤ 40	11(34.38)	12(80.00)	0.004 ^c
>40	21(65.63)	3(20.00)	
Tumor size (mean \pm SD)	22.29(15.30)	24.59(14.70)	0.6547 ^t
Depth of invasion - inner third	10(47.62)	4(28.56)	0.260 ^c
- \geq middle third	11(52.38)	10(71.43)	
LVSI - negative	8(36.36)	4(28.57)	0.629 ^c
- positive	14(63.64)	10(71.43)	
Parametrial involvement - negative	16(80.00)	11(84.62)	1.000 ^f
- positive	4(20.00)	2(15.38)	
Lymph node - negative	17(80.95)	12(92.31)	0.627 ^f

	- positive	4(19.05)	1(7.69)	
Recurrence	- negative	20(71.43)	9(60.00)	0.446 ^c
	- positive	8(28.57)	6(40.00)	
HPV16	- negative	19(70.37)	11(84.62)	0.451 ^f
	- positive	8(29.63)	2(15.38)	
HPV18	- negative	7(25.93)	1(7.69)	0.236 ^f
	- positive	20(74.07)	12(92.31)	
C-kit	- negative	28(87.50)	12(80.00)	0.664 ^f
	- positive	4(12.50)	3(20.00)	

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ survivin expression (survivin positive) และ กลุ่มที่ไม่พบ survivin expression (survivin negative) ในระยะต้นของโรค (early stage) พบว่า กลุ่มที่ survivin positive พบผู้ป่วยที่มีอายุน้อย (≤ 40) (12/15, 80.00%) ได้มากกว่ากลุ่มที่ survivin negative (11/32, 34.38%, $p=0.004$) ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 8: Correlation of survivin and other parameters in all stages (^t=t-test, ^c=chi-square test, ^f=Fisher' exact test)

Parameter	n (%)	n (%)	P value ^{test}
	Survivin -	Survivin +	
Age ≤ 40	18(32.73)	14(70.00)	0.004 ^c
>40	37(67.27)	6(30.00)	
Stage \leq IIA	32(59.26)	15(78.95)	0.123 ^c
>IIA	22(40.74)	4(21.05)	
Tumor size (mean \pm SD)	22.17(14.95)	24.59(14.70)	0.6327 ^t
Depth of invasion - inner third	10(45.45)	4(28.57)	0.311 ^c
- \geq middle third	12(54.55)	10(71.43)	
LVSI - negative	8(34.78)	4(28.57)	1.000 ^f
- positive	15(65.22)	10(71.43)	
Parametrial involvement - negative	17(80.95)	11(84.62)	1.000 ^f
- positive	4(19.05)	2(15.38)	
Lymph node - negative	18(81.82)	12(92.31)	0.630 ^f

	- positive	4(18.18)	1(7.69)	
Recurrence	- negative	23(62.16)	11(57.89)	0.757 ^c
	- positive	14(37.84)	8(42.11)	
HPV	- negative	3(6.38)	0(0.00)	0.555 ^f
	- positive	44(93.62)	18(100.00)	
HPV16	- negative	35(74.47)	15(83.33)	0.529 ^f
	- positive	12(25.53)	3(16.17)	
HPV18	- negative	12(25.53)	1(5.56)	0.091 ^f
	- positive	35(74.47)	17(94.44)	
C-kit	- negative	51(92.73)	17(85.00)	0.375 ^f
	- positive	4(7.27)	3(15.00)	

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ survivin expression (survivin positive) และ กลุ่มที่ไม่พบ survivin expression (survivin negative) ในทุกระยะของโรค พบว่ากลุ่มที่ survivin positive พบผู้ป่วยที่มีอายุน้อย (≤ 40) (14/20, 70.00%) ได้มากกว่ากลุ่มที่ survivin negative (18/55, 32.72%, $p=0.004$) ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 9: Correlation of c-kit and other parameters in early stages (^t=t-test, ^c=chi-square test, ^f=Fisher' exact test)

Parameter	n (%)	n (%)	P value ^{test}	
	c-kit -	c-kit +		
Age ≤ 40	20(50.00)	3(42.86)	1.000 ^f	
>40	20(50.00)	4(57.14)		
Tumor size (mean \pm SD)	21.69(14.26)	28.19(17.57)	0.3283 ^t	
Depth of invasion - inner third	12(42.86)	2(28.57)	0.676 ^f	
- \geq middle third	16(57.14)	5(71.43)		
LVSI	- negative	10(34.48)	2(28.57)	1.000 ^f
	- positive	19(65.52)	5(71.43)	
Parametrial involvement	- negative	22(84.62)	5(71.43)	0.548 ^f
	- positive	4(15.38)	2(28.57)	
Lymph node	- negative	23(85.19)	6(85.71)	1.000 ^f

	- positive	4(14.81)	1(14.29)	
Recurrence	- negative	24(66.67)	5(71.43)	1.000 ^f
	- positive	12(33.33)	2(14.29)	
HPV16	- negative	26(76.47)	4(66.67)	0.609 ^c
	- positive	8(23.53)	2(33.33)	
HPV18	- negative	5(14.71)	3(50.00)	0.082 ^c
	- positive	29(85.29)	3(50.00)	
Survivin	- negative	28(70.00)	4(57.14)	0.664 ^f
	- positive	12(30.00)	3(42.86)	

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ c-kit expression (c-kit positive) และ กลุ่มที่ไม่พบ c-kit expression (c-kit negative) ในระยะต้นของโรค (early stage) ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับปัจจัยใดเลย ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 10 Correlation of c-kit and other parameters in all stages (^t=t-test, ^c=chi-square test, ^f=Fisher' exact test)

Parameter	n (%)	n (%)	P value ^{test}
	c-kit -	c-kit +	
Age ≤40	29(42.65)	3(42.86)	1.000 ^f
>40	39(57.35)	4(57.14)	
Stage ≤IIA	40(60.61)	7(100.00)	0.046 ^f
>IIA	26(39.39)	0(0.00)	
Tumor size (mean±SD)	21.90(14.02)	28.19(17.57)	0.4031 ^t
Depth of invasion - inner third	12(41.38)	2(28.57)	0.0681 ^f
- ≥ middle third	17(58.62)	5(71.43)	
LVSI - negative	10(33.33)	2(28.57)	1.000 ^f
- positive	20(66.67)	5(71.43)	
Parametrial involvement - negative	23(85.19)	5(71.43)	0.580 ^f
- positive	4(14.81)	2(28.57)	
Lymph node - negative	24(85.81)	6(85.81)	1.000 ^f
- positive	4(14.29)	1(14.29)	

Recurrence	- negative	29(59.18)	5(71.43)	0.692 ^f
	- positive	20(40.82)	2(28.57)	
HPV	- negative	3(5.08)	0(0.00)	1.000 ^f
	- positive	56(94.92)	6(100.00)	
HPV16	- negative	46(77.97)	4(66.67)	0.615 ^f
	- positive	13(22.03)	2(33.33)	
HPV18	- negative	10(16.95)	3(50.00)	0.089 ^f
	- positive	49(83.05)	3(50.00)	
Survivin	- negative	51(75.00)	4(57.14)	0.374 ^f
	- positive	17(25.00)	3(42.86)	

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ c-kit expression (c-kit positive) และ กลุ่มที่ไม่พบ c-kit expression (c-kit negative) ในทุกระยะของโรค พบว่ากลุ่มที่ c-kit positive เป็นผู้ป่วยในระยะต้น (Stage \leq IIA) (7/7, 100.00%) มากกว่ากลุ่มที่ c-kit negative (40/66, 60.61%, p=0.046) ดังตารางที่ 10

1.6. การเปรียบเทียบลักษณะต่างๆของมะเร็งกลุ่มที่มีและไม่มี lymph node metastasis ได้แสดงไว้ในตารางที่ 11 และ 12

ตารางที่ 11: Correlation of lymph node status and other parameters in early stages (^t=t-test, ^c=chi-square test, ^f=Fisher' exact test)

Parameter	n (%)	n(%)	P value ^{test}	
	LN -	LN +		
Age \leq 40	15(51.72)	3(60.00)	1.000 ^f	
>40	14(48.28)	2(40.00)		
Tumor size (mean \pm SD)	21.90(14.70)	35.2(13.00)	0.0672 ^t	
Depth of invasion	- inner third	13(44.83)	0(0.00)	0.136 ^f
	- \geq middle third	16(55.17)	4(100.00)	
LVSI	- negative	12(41.38)	0(0.00)	0.137 ^f
	- positive	17(58.62)	5(100.00)	
Parametrial involvement	- negative	26(89.66)	1(25.00)	0.014 ^f
	- positive	3(10.34)	3(75.00)	

Recurrence	- negative	23(79.31)	1(20.00)	0.019 ^f
	- positive	6(20.69)	4(80.00)	
HPV16	- negative	19(73.08)	3(60.00)	0.613 ^f
	- positive	7(26.92)	2(40.00)	
HPV18	- negative	7(26.92)	0(0.00)	0.562 ^f
	- positive	19(73.08)	5(100.00)	
Survivin	- negative	17(58.62)	4(80.00)	0.627 ^f
	- positive	12(41.38)	1(20.00)	
C-kit	- negative	23(79.31)	4(80.00)	1.000 ^f
	- positive	6(20.69)	1(20.00)	

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ lymph node metastasis (LN positive) และกลุ่มที่ไม่พบ lymph node metastasis (LN negative) ในระยะต้นของโรค (early stage) พบว่ากลุ่มที่ LN positive ผู้ป่วยมี parametrial involvement (3/4, 75.00%) มากกว่ากลุ่มที่ LN negative (3/29, 10.34%, p=0.014) กลุ่มที่ LN positive ผู้ป่วยมี disease recurrence (4/5, 80.00%) มากกว่ากลุ่มที่ LN negative (6/29, 20.69%, p=0.019) ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 12: Correlation of lymph node status and other parameters in all stages (^t=t-test, ^c=chi-square test, f=Fisher' exact test)

Parameter	n (%)	n (%)	P value ^{test}
	LN -	LN +	
Age ≤40	15(50.00)	3(60.00)	1.000 ^f
>40	15(50.00)	2(40.00)	
Stage ≤IIA	29(96.67)	5(100.00)	1.000 ^f
>IIA	1(3.33)	0(0.00)	
Tumor size (mean±SD)	21.84(14.44)	35.2(12.99)	0.0828 ^t
Depth of invasion - inner third	13(43.33)	0(0.00)	0.144 ^f
- ≥ middle third	17(56.67)	4(100.00)	
LVS1 - negative	12(40.00)	0(0.00)	0.141 ^f
- positive	18(16.00)	5(100.00)	
Parametrial involvement - negative	27(90.00)	1(25.00)	0.012 ^f

	- positive	3(10.00)	3(75.00)	
Recurrence	- negative	23(76.67)	1(20.00)	0.026 ^f
	- positive	7(23.33)	4(80.00)	
HPV	- negative	1(3.70)	0(0.00)	1.000 ^f
	- positive	26(96.30)	5(100.00)	
HPV16	- negative	20(74.07)	3(60.00)	0.604 ^f
	- positive	7(25.93)	2(40.00)	
HPV18	- negative	7(25.93)	0(0.00)	0.560 ^f
	- positive	20(74.07)	5(100.00)	
Survivin	- negative	18(60.00)	4(80.00)	0.630 ^f
	- positive	12(40.00)	1(20.00)	
C-kit	- negative	24(80.00)	4(80.00)	1.000 ^f
	- positive	6(20.00)	1(20.00)	

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ lymph node metastasis (LN positive) และกลุ่มที่ไม่พบ lymph node metastasis (LN negative) ในทุกระยะของโรค (all stage) พบว่ากลุ่มที่ LN positive ผู้ป่วยมี parametrial involvement (3/4, 75.00%) มากกว่ากลุ่มที่ LN negative (3/30, 10.34%, p=0.012) และกลุ่มที่ LN positive ผู้ป่วยมี disease recurrence (4/5, 80.00%) มากกว่ากลุ่มที่ LN negative (7/30, 23.33%, p=0.026) ดังตารางที่ 12

1.7 การเปรียบเทียบลักษณะต่างๆของมะเร็งกลุ่มที่มีและไม่มี recurrence ได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 13 และ 14

ตารางที่ 13: Correlation of disease recurrence and other parameters in early stages (^t=t-test, ^c=chi-square test, ^f=Fisher' exact test)

Parameter	n (%)	n (%)	P value ^{test}
	Recur -	Recur +	
Age ≤40	14(48.28)	7(50.00)	0.916 ^c
>40	15(51.72)	7(50.00)	
Tumor size (mean±SD)	20.82(15.39)	29.30(12.15)	0.0973 ^t
Depth of invasion - inner third	13(52.00)	1(10.00)	0.028 ^f

	- \geq middle third	12(48.00)	9(90.00)	
LVSI	- negative	11(42.31)	1(10.00)	0.115 ^f
	- positive	15(57.69)	9(90.00)	
Parametrial involvement	- negative	20(86.96)	7(70.00)	0.336 ^f
	- positive	3(13.04)	3(30.00)	
Lymph node	- negative	23(95.83)	6(60.00)	0.019 ^f
	- positive	1(4.17)	4(40.00)	
HPV16	- negative	19(76.00)	8(66.67)	0.676 ^f
	- positive	6(24.00)	4(33.33)	
HPV18	- negative	7(28.00)	1(8.33)	0.232 ^f
	- positive	18(72.00)	11(91.67)	
Survivin	- negative	20(68.97)	8(57.14)	0.446 ^c
	- positive	9(31.03)	6(42.86)	
C-kit	- negative	24(82.76)	12(85.71)	1.000 ^f
	- positive	5(17.24)	2(14.29)	

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ disease recurrence (recur positive) และ กลุ่มที่ไม่พบ disease recurrence (recur negative) ในระยะต้นของโรค (early stage) พบว่ากลุ่มที่ recur positive ผู้ป่วยมี depth of invasion (9/10, 90.00%) มากกว่ากลุ่มที่ recur negative (12/25, 48.00%, $p=0.028$) และกลุ่มที่ recur positive ผู้ป่วยมี lymph node metastasis (4/10, 40.00%) มากกว่ากลุ่มที่ recur negative (1/24, 4.17%, $p=0.019$) ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 14: Correlation of disease recurrence and other parameters in all stages (^t=t-test, ^c=chi-square test, ^f=Fisher' exact test)

Parameter	n (%)	n (%)	P value ^{test}
	Recur -	Recur +	
Age ≤ 40	15(44.12)	9(40.91)	0.813 ^c
>40	19(55.88)	13(59.09)	
Stage \leq IIA	29(85.29)	14(63.64)	0.061 ^c
>IIA	5(14.71)	8(36.36)	
Tumor size (mean \pm SD)	20.82(15.39)	28.45(11.86)	0.1154 ^t

Depth of invasion - inner third	13(52.00)	1(9.09)	0.025 ^f
- \geq middle third	12(48.00)	10(90.91)	
LVSI - negative	11(42.13)	1(9.09)	0.064 ^f
- positive	15(57.69)	10(90.91)	
Parametrial involvement - negative	20(86.96)	8(72.73)	0.363 ^f
- positive	3(13.04)	3(27.27)	
Lymph node - negative	23(95.83)	7(73.64)	0.026 ^f
- positive	1(4.17)	4(36.36)	
HPV - negative	1(3.33)	1(5.00)	1.000 ^f
- positive	29(96.67)	19(95.00)	
HPV16 - negative	24(80.00)	16(80.00)	1.000 ^f
- positive	6(20.00)	4(20.00)	
HPV18 - negative	7(23.33)	3(15.00)	0.720 ^f
- positive	23(76.67)	17(85.00)	
Survivin - negative	23(67.65)	14(63.64)	0.757 ^c
- positive	11(32.35)	8(36.36)	
C-kit - negative	29(85.29)	20(90.91)	0.692 ^f
- positive	5(14.71)	2(9.09)	

เมื่อเปรียบเทียบ กลุ่มมะเร็งปากมดลูกที่พบ disease recurrence (recur positive) และกลุ่มที่ไม่พบ disease recurrence (recur negative) ในทุกระยะของโรค (all stage) พบว่ากลุ่มที่ recur positive ผู้ป่วยมี depth of invasion (10/11, 90.91%) มากกว่ากลุ่มที่ recur negative (12/25, 48.00%, $p=0.025$) และกลุ่มที่ recur positive ผู้ป่วยมี lymph node metastasis (4/11, 36.36%) มากกว่ากลุ่มที่ recur negative (1/24, 4.17%, $p=0.026$) ดังตารางที่ 14

ผลการทดลองส่วนที่ 2: ความสัมพันธ์ระหว่าง protein expression, clinico-pathologic parameter กับ disease recurrence ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

จาก Univariate analysis ปัจจัยที่สัมพันธ์กับDisease recurrence ในทุกระยะของโรค (all stage) ได้แก่ lymph node metastasis, depth of invasion และระยะของโรค โดยพบว่า

- ผู้ป่วยที่มี lymph node metastasis จะมีความเสี่ยงที่จะเกิด recurrence หรือ metastasis ได้มากกว่าผู้ป่วยที่ไม่มี lymph node metastasis 6.4 เท่า (p=0.006)
- ผู้ป่วยที่มี depth of tumor invasion มากกว่า inner third จะมีความเสี่ยงที่จะเกิด recurrence หรือ metastasis ได้มากกว่าผู้ป่วยที่มี depth of tumor invasion น้อยกว่า inner third lymph node metastasis 8.3 เท่า (p=0.045)
- ผู้ป่วยที่อยู่ในระยะลุกลามของโรค (stage >IIA) จะมีความเสี่ยงที่จะเกิด recurrence หรือ metastasis ได้มากกว่าผู้ป่วยที่อยู่ในระยะต้นของโรค (stage ≤IIA) 2.6 เท่า (p=0.042)

ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15: Univariate analysis สำหรับปัจจัยที่สัมพันธ์กับdisease recurrence in all stage

Parameter	Hazard ratio	(95% CI)	P-value
- Lymph node metastasis	6.40	(1.70-24.22)	0.006*
- Parametrial involvement	1.95	(0.50-7.57)	0.334
- Lymphovascular space invasion	5.65	(0.72-44.65)	0.101
- Survivin (nuclear)	0.82	(0.11-6.13)	0.848
- Survivin(nuclear and cytoplasmic)	1.28	(0.53-3.09)	0.582
- Survivin (cytoplasmic)	1.37	(0.55-3.40)	0.68
- c-kit (cytoplasmic and membrane)	0.69	(0.16-2.96)	0.613
- C-kit (membrane)	1.37	(0.31-5.92)	0.673
- HPV infection	0.74	(0.10-5.63)	0.770
- Type 16	1.20	(0.10-5.63)	0.753
- Type 18	1.25	(0.36-4.34)	0.723
- Age(>40 years)	1.15	(0.48-2.74)	0.748
- Depth of invasion (more than inner third)	8.32	(1.04-66.25)	0.045*
- Tumor size (>4cm)	0.71	(0.09-5.61)	0.743
- Advanced stage (>IIa)	2.57	(1.03-6.39)	0.042*

จาก Univariate analysis ปัจจัยที่สัมพันธ์กับDisease recurrence ในระยะต้นของโรค (early stage) ได้แก่ lymph node metastasis และ depth of invasion โดยพบว่า

- ผู้ป่วยที่มี lymph node metastasis จะมีความเสี่ยงที่จะเกิด recurrence หรือ metastasis ได้มากกว่าผู้ป่วยที่ไม่มี lymph node metastasis 6.8 เท่า (p=0.005)
- ผู้ป่วยที่มี depth of tumor invasion มากกว่า inner third จะมีความเสี่ยงที่จะเกิด recurrence หรือ metastasis ได้มากกว่าผู้ป่วยที่มี depth of tumor invasion น้อยกว่า inner third lymph node metastasis 8.4 เท่า (p=0.044)

ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16: Univariate analysis สำหรับปัจจัยที่สัมพันธ์กับ disease recurrence in early stage

Parameter	Hazard ratio	(95% CI)	P-value
- Lymph node metastasis	6.80	(1.81-25.59)	0.005*
- Parametrial involvement	2.00	(0.52-7.78)	0.313
- Lymphovascular space invasion	5.73	(0.73-45.28)	0.098
- Survivin(nuclear and cytoplasmic)	1.58	(0.55-4.58)	0.395
- c-kit (cytoplasmic and membrane)	0.86	(0.19-3.90)	0.848
- HPV type 16	1.83	(0.54-6.17)	0.331
- HPV type 18	2.77	(0.35-21.75)	0.331
- Age(>40 years)	1.08	(0.38-3.09)	0.882
- Depth of invasion (more than inner third)	8.44	(1.06-67.20)	0.044*
- Tumor size (>4cm)	1.04	(0.99-1.08)	0.743

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติมแบบ multivariate analysis ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ Disease recurrence ในทุกระยะของโรค (all stage) อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ stage (p<0.0001) และ ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ Disease recurrence ใน early stage อย่างมีนัยสำคัญ ได้แก่ HPV 18 (p<0.0001)

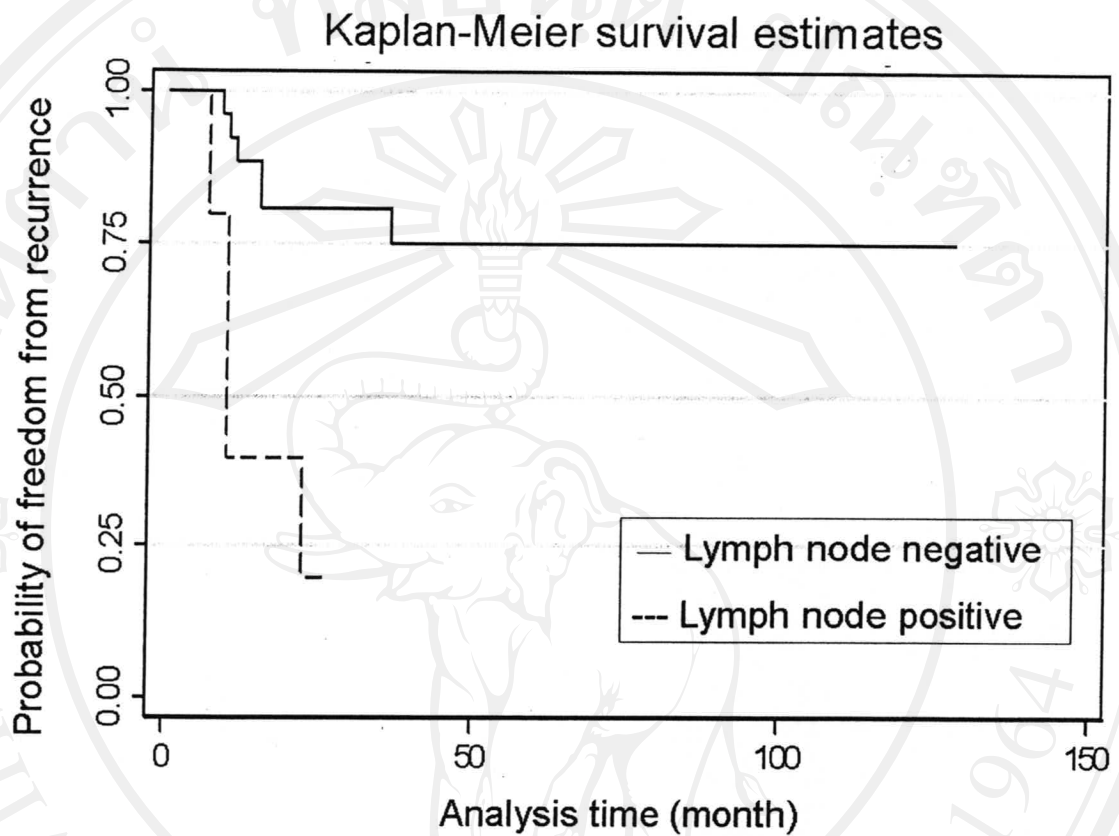
Protein expression ที่ศึกษา ไม่มีความสัมพันธ์กับ disease recurrence เลย

ผลการทดลองส่วนที่ 3: ความสัมพันธ์ระหว่าง protein expression, clinico-pathologic parameter กับ disease free survival ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

จาก multivariate analysis พบเพียง 1 ปัจจัยที่สัมพันธ์กับ disease free survival ได้แก่ lymph node metastasis ทั้งใน early stage และ all stage อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.0001)

Protein expression ที่ศึกษา ไม่มีความสัมพันธ์กับ disease free survival เลย

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูล disease free survival ของผู้ป่วยในกลุ่ม lymph node negative และ lymph node positive พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1: Kaplan-Meier plot แสดง disease free survival ในกลุ่มที่ lymph node negative และกลุ่มที่ lymph node positive

เนื้อหางานวิจัย -บทวิจารณ์

บทวิจารณ์ส่วนที่ 1: การแสดงออกของ survivin, c-erbB-2 และ c-kit และความสัมพันธ์ระหว่าง protein expression และ clinico-pathologic parameter ในผู้ป่วยมะเร็งปอกมดลูกชนิด small cell carcinoma

1.5 การแสดงออกของ survivin ในผู้ป่วยมะเร็งปอกมดลูกชนิด small cell carcinoma พบน้อย กล่าวคือพบ nuclear expression 4%(3/75), cytoplasmic expression 22.67%(17/75) และมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับอายุของผู้ป่วย(p=0.004, negative correlation) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับ clinico-pathologic parameter หรือ protein expression อื่น

มีการศึกษาการแสดงออกของ survivin และ พบ survivin expression ในมะเร็งหลายชนิด และมีเกี่ยวข้องกับ chemotherapy resistance, tumor recurrence , unfavorable prognosis โดยเฉพาะ nuclear expression ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีของมะเร็งหลายชนิดเช่น hepatocellular carcinoma, esophageal squamous cell carcinoma, gastrointestinal neuroendocrine tumor, ovarian carcinoma, non-small cell lung cancer และ cholangiocarcinoma ในทางกลับกัน nuclear expression of survivin สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ดีของ gastric cancer, transitional cell carcinoma, breast cancer, osteosarcoma และ ependymomas [14, 44]

ส่วนเนื้อเยื่อปอกมดลูกพบ survivin expression ทั้งใน benign squamous epithelium, squamous intraepithelial lesion และ squamous cell carcinoma โดยเฉพาะ squamous cell carcinoma พบ survivin expression สูงถึง 98.6% [45, 46] แต่ยังไม่พบการศึกษา survivin expression ใน cervical small cell carcinoma

เนื่องจากผลการทดลองที่พบว่ามี survivin expression ใน cervical small cell carcinoma น้อยมาก การใช้ survivin เป็น target therapy จึงมีโอกาสน้อย

1.6 การแสดงออกของ c-kit ในผู้ป่วยมะเร็งปอกมดลูกชนิด small cell carcinoma การศึกษานี้พบ c-kit expression น้อยกว่าการศึกษาของ Wang HL, et al [47] และ Ohwada M, et al [48] ดังตารางที่ 17 ซึ่งอาจเนื่องจากความเข้มข้นของ primary antibody ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 19: C-kit expression in cervical small cell carcinoma

	การศึกษานี้ % (n/ total)	Wang HL 2004 %(n/ total)	Ohwada M 2005 %(n/ total)
c-kit expression	9.33%(7/75)	27.27% (6/22)	42.86(9/21)

นอกจากนั้นการศึกษานี้ยังพบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่าง c-kit expression กับ

stage (p=0.046, positive correlation) แตกต่างจากการศึกษาของ Wang HL, et al (47) ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าว แต่การศึกษาทั้งสองได้ผลเช่นเดียวกันว่า c-kit expression ไม่สัมพันธ์กับอายุของผู้ป่วยและการพยากรณ์โรค

ถึงแม้ว่าจะพบ c-kit expression น้อยแต่ผู้ป่วยที่มี positive c-kit expression น่าจะมีโอกาสที่จะได้รับการรักษาด้วย tyrosine kinase inhibitor (Gleevec, imatinib mesylate) ซึ่งได้ผลดีในการรักษา gastrointestinal stromal tumor แต่ในขณะนี้ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการรักษา cervical small cell carcinoma ด้วยยาดังกล่าวและต้องอาศัยการศึกษาต่อไป

1.7 การแสดงออกของ c-erbB-2 ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma การศึกษานี้ไม่พบ c-erbB-2 expression คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Straughn JM, et al (48) 0%(0/16) แต่แตกต่างจากการศึกษาของ Tangjitkamol S, et al (2) ซึ่ง พบ c-erbB-2 expression สูงถึง 41.7%(10/24)

1.8 เมื่อทำการทดสอบความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆที่ศึกษา พบว่า

- Lymph node metastasis มีความสัมพันธ์กับ

- parametrial involvement ผู้ป่วยที่มี parametrial involvement จะมี lymph node metastasis มากกว่า (P=0.012, positive correlation)
- การกลับเป็นโรคซ้ำ(disease recurrence)ผู้ป่วยที่มี lymph node metastasis จะมี disease recurrence มากกว่า (P=0.026, positive correlation)

- Parametrial involvement มีความสัมพันธ์กับ

- ขนาดของมะเร็ง (size) ผู้ป่วยที่มีมะเร็งขนาดใหญ่จะมี parametrial involvement I มากกว่ามะเร็งขนาดเล็ก (P=0.0007, positive correlation)
- lymph node metastasis ดังกล่าวข้างต้น

- Lymphovascular space invasion มีความสัมพันธ์กับ

- ขนาดของมะเร็ง (size) ผู้ป่วยที่มีมะเร็งขนาดใหญ่จะมี lymphovascular space invasion มากกว่ามะเร็งขนาดเล็ก (P<0.0001, positive correlation)
- depth of invasion ผู้ป่วยที่มี depth of invasion มากกว่า inner third จะมี lymphovascular space invasion ผู้ป่วยที่มี depth of invasion ภายใน inner third(p=0.029, positive correlation)
- HPV type 18 ผู้ป่วยที่มี ตรวจพบHPV type 18 จะมี lymphovascular space invasion ผู้ป่วยที่ไม่ตรวจพบ(p=0.024, positive correlation)

- Depth of invasion มีความสัมพันธ์กับ

- ขนาดของมะเร็ง (size) ผู้ป่วยที่มีมะเร็งขนาดใหญ่จะมี depth of invasion มากกว่า มะเร็งขนาดเล็ก (P=0.0031, positive correlation)
- การกลับเป็นโรคซ้ำ(disease recurrence) ผู้ป่วยที่มี depth of invasion มากกว่า inner third จะมี disease recurrence ผู้ป่วยที่มี depth of invasion ภายใน inner third(p=0.025, positive correlation)
- ระยะของโรคมี่ความสัมพันธ์กับ c-kit expression ผู้ป่วยที่มี positive c-kit expression จะอยู่ใน FIGO stage \geq IIA ผู้ป่วยที่มี negative c-kit expression จะอยู่ใน FIGO stage \leq IIA (p=0.046, positive expression)
- HPV type 16, ตำแหน่งของการกลับเป็นโรคซ้ำ (site of recurrence) ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับปัจจัยใดเลย

บทวิจารณ์ส่วนที่ 2 และ 3: ความสัมพันธ์ระหว่าง protein expression, clinico-pathologic parameter กับ disease recurrence และ disease free survival ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma

การศึกษานี้พบปัจจัยที่สัมพันธ์กับDisease recurrence ในผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ได้แก่ lymph node metastasis, depth of invasion และระยะของโรค (FIGO stage) ส่วน Protein expression ที่ศึกษา ไม่มีความสัมพันธ์กับ disease recurrence เลย

ปัจจัยที่สัมพันธ์กับdisease free survival พบเพียง 1 ปัจจัยได้แก่ lymph node metastasis ทั้งในearly stage และ all stage อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.0001) ส่วน Protein expression ที่ศึกษา ไม่มีความสัมพันธ์กับ disease free survival เลย

รายงานเกี่ยวกับ cervical small cell carcinoma ที่ผ่านมา ระบุว่าปัจจัยที่สัมพันธ์กับการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี ได้แก่ large tumor size, lymph node metastasis, smoking, stage, deep stromal invasion (49)

มีรายงานที่พบว่า c-erbB-2 expression มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ disease free survival โดยพบว่าผู้ป่วยที่มี negative c-erbB-2 expression มี survival สั้นกว่าผู้ป่วยที่มี positive c-erbB-2 expression ส่วน c-kit expression ไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ survival

เนื้อหางานวิจัย –สรุป

1. cervical small cell carcinoma มีการแสดงออกของ survivin, c-kit และ c-erbB-2 ใน สัดส่วนที่น้อย
2. ผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma ซึ่งมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีและหากไม่ตอบสนองต่อการรักษามาตรฐานอาจจะได้รับประโยชน์จากการรักษาด้วย targeted therapy โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มี positive c-kit expression น่าจะมีโอกาสที่จะได้รับการรักษา ด้วย tyrosine kinase inhibitor (Gleevec, imatinib mesylate) ซึ่งได้ผลดีในการรักษา gastrointestinal stromal tumor

เนื้อหางานวิจัย: ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

การศึกษา protein expression ชนิดอื่นเช่น COX-2 ใน cervical small cell carcinoma metastatic lymph node ที่อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งและการกระจายของมะเร็ง นำไปสู่องค์ความรู้ที่กว้างขวางและใหม่ยิ่งขึ้น ในแง่ของกลไกการเกิดมะเร็ง ซึ่งแน่นอนว่าความรู้เหล่านี้จะนำไปสู่การคิดค้นมาตรการใหม่ๆ ในการป้องกันและรักษาโรคมะเร็ง

เนื้อหางานวิจัย -หนังสืออ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

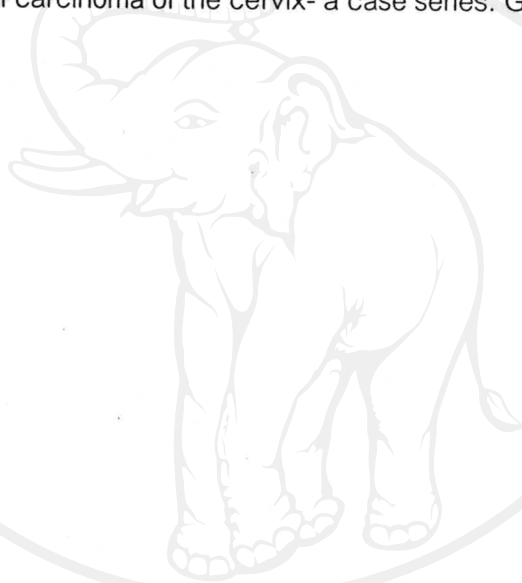
1. Ohwada M, Wada T, Saga Y, Tsunoda S, Jobo T, Kuramoto H, et al. C-kit overexpression in neuroendocrine small cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006;27(1):53-5.
2. Tangjitgamol S, Ramirez PT, Sun CC, See HT, Jhingran A, Kavanagh JJ, et al. Expression of HER-2/neu, epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2, estrogen receptor, and progesterone receptor in small cell and large cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: a clinicopathologic and prognostic study. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15(4):646-56.
3. National Cancer Institute. Surveillance Epidemiology and End-Results. Washington (DC): Department of Health and Human Service; 1998.
4. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D. Globocan 2000: Cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide, version 1.0. IARC CancerBase no. 5. Lyon: IARC Press; 2001.
5. Sriplung H, Sontipong S, Martin N, Wiangnon S, Vootiprux V, Cheirsilpa A, et al. *Cancer in Thailand, Vol III* 2003:49-50.
6. Crum CP, Rose PG. Cervical squamous neoplasia. In: Crum CP, Lee KR, editors. *Diagnostic gynecologic and obstetric pathology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. p. 267-354.
7. Crum CP. The female genital tract. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. *Robbins and Cotran. Pathologic basis of disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2004. p. 1059-117.
8. van Nagell JR, Jr., Powell DE, Gallion HH, Elliott DG, Donaldson ES, Carpenter AE, et al. Small cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1988;62(8):1586-93.
9. Nucci MN, Crum CP. Neuroendocrine carcinoma, mixed epithelial/mesenchymal and mesenchymal tumors and miscellaneous lesion of the cervix. In: Crum CP, Lee KR, editors. *Diagnostic gynecologic and obstetric pathology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006. p. 411-40.
10. Weed JC, Jr., Graff AT, Shoup B, Tawfik O. Small cell undifferentiated (neuroendocrine) carcinoma of the uterine cervix. *J Am Coll Surg* 2003;197(1):44-51.

11. Wang KL, Yang YC, Wang TY, Chen JR, Chen TC, Chen HS, et al. Neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: A clinicopathologic retrospective study of 31 cases with prognostic implications. *J Chemother* 2006;18(2):209-16.
12. Boruta DM, 2nd, Schorge JO, Duska LA, Crum CP, Castrillon DH, Sheets EE. Multimodality therapy in early-stage neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2001;81(1):82-7.
13. Trattner M, Graf AH, Lax S, Forstner R, Dandachi N, Haas J, et al. Prognostic factors in surgically treated stage ib-iiB cervical carcinomas with special emphasis on the importance of tumor volume. *Gynecol Oncol* 2001;82(1):11-6.
14. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 2006;5(5):1087-98.
15. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22(53):8581-9.
16. Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Hopfner M, et al. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;88(1):115-9.
17. Shinohara ET, Gonzalez A, Massion PP, Chen H, Li M, Freyer AS, et al. Nuclear survivin predicts recurrence and poor survival in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2005;103(8):1685-92.
18. Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002;21(2):315-20.
19. Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M, et al. Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett* 2001;163(1):109-16.
20. Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, et al. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem* 2004;50(11):1986-93.
21. Span PN, Tjan-Heijnen VC, Sweep FC. Is survivin expression nevertheless related to disease outcome in breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 2007;103(1):109.

22. Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 1999;113(6):1076-81.
23. Kappler M, Kotzsch M, Bartel F, Fussel S, Lautenschlager C, Schmidt U, et al. Elevated expression level of survivin protein in soft-tissue sarcomas is a strong independent predictor of survival. *Clin Cancer Res* 2003;9(3):1098-104.
24. Pizem J, Cor A, Gale N. Survivin expression is a negative prognostic marker in laryngeal squamous cell carcinoma and is associated with p53 accumulation. *Histopathology* 2004;45(2):180-6.
25. Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, et al. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients. *Surgery* 2004;136(2):443-8.
26. Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I. Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2002;184(1):105-16.
27. Morinaga S, Nakamura Y, Ishiwa N, Yoshikawa T, Noguchi Y, Yamamoto Y, et al. Expression of survivin mRNA associates with apoptosis, proliferation and histologically aggressive features in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2004;12(6):1189-94.
28. Schlette EJ, Medeiros LJ, Goy A, Lai R, Rassidakis GZ. Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2004;22(9):1682-8.
29. Branca M, Giorgi C, Santini D, et al. Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer. *Am J Clin Pathol* 2005;124:113-21.
30. Kim HS, Shiraki K, Park SH. Expression of survivin in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Anticancer Res* 2002;22:805-8.
31. Singh A, Sharma H, Salhan S, et al. Evaluation of expression of apoptosis-related proteins and their correlation with HPV, telomerase activity, and apoptotic index in cervical cancer. *Pathobiology* 2004;71:314-22.
32. Blanc-Brude OP, Mesri M, Wall NR, Plescia J, Dohi T, Altieri DC. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and suppression of tumor-associated angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2003;9(7):2683-92.

33. Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001;108(7):981-90.
34. Zhang M, Latham DE, Delaney MA, Chakravarti A. Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer. *Oncogene* 2005;24(15):2474-82.
35. Wall NR, O'Connor DS, Plescia J, Pommier Y, Altieri DC. Suppression of survivin phosphorylation on Thr34 by flavopiridol enhances tumor cell apoptosis. *Cancer Res* 2003;63(1):230-5.
36. Hayashi N, Asano K, Suzuki H, Yamamoto T, Tanigawa N, Egawa S, et al. Adenoviral infection of survivin antisense sensitizes prostate cancer cells to etoposide in vivo. *Prostate* 2005;65(1):10-9.
37. Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, Kato K, Dehari H, Ito Y, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo. *Mol Ther* 2004;10(1):162-71.
38. Kanwar JR, Shen WP, Kanwar RK, Berg RW, Krissansen GW. Effects of survivin antagonists on growth of established tumors and B7-1 immunogene therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(20):1541-52.
39. Caldas H, Holloway MP, Hall BM, Qualman SJ, Altura RA. Survivin-directed RNA interference cocktail is a potent suppressor of tumour growth in vivo. *J Med Genet* 2006;43(2):119-28.
40. Tu SP, Cui JT, Liston P, Huajiang X, Xu R, Lin MC, et al. Gene therapy for colon cancer by adeno-associated viral vector-mediated transfer of survivin Cys84Ala mutant. *Gastroenterology* 2005;128(2):361-75.
41. Plescia J, Salz W, Xia F, Pennati M, Zaffaroni N, Daidone MG, et al. Rational design of shepherdin, a novel anticancer agent. *Cancer Cell* 2005;7(5):457-68.
42. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 2007;357(1):39-51.
43. Rubin BP, Heinrich MC, Corless CL. Gastrointestinal stromal tumour. *Lancet* 2007;369(9574):1731-41.
44. Le F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or Cytoplasmic expression of survivin: what is the significance?. *Int. J Cancer* 2005;114:509-12

45. Tan GC, Norlatiffah S, Sharifah NA, Raxmin G, Shidan MS, Hatta AZ, et al. Immunohistochemical study of p16^{INK4A} and survivin expression in cervical squamous neoplasm. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 2010;53(1)
46. Frost M, Jarboe E, Orlicky D, Gianani R, Thompson LC, Enomoto T, et al. Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2002;117:738-44
47. Wang HL, Lu DW. Overexpression of c-kit protein is an infrequent event in small cell carcinomas of the uterine cervix. *Modern Pathology* 2004;17:732-8
48. Straughn JM, Richter HE, Conner MG, Meleth S, Barnes MN. Predictors of outcome in small cell carcinoma of the cervix- a case series. *Gynecol Oncol* 2001;83:216-20



CHIANG MAI UNIVERSITY 1964

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Output

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการนานาชาติ 1 เรื่อง **ดูภาคผนวก 1** (ได้ผลไม่น้อยกว่าผลงานที่คาดหวัง คือ อย่างน้อย 1 เรื่อง) ได้แก่
 - a. Sukpan K, **Settakorn J**, Khunamornpong S, Cheewakriangkrai C, Srisomboon J , Siriaunkgul S. Expression of survivin, CD117, and C-erb-B2 in cervical neuroendocrine carcinoma (อยู่ในระหว่างเตรียมส่งตีพิมพ์)
2. ผลงานตามที่คาดหวัง
 - a. ได้ validate IHC lab สำหรับ survivin, c-erbB-2 และ c-kit expression เพื่อใช้ใน งานวิจัย และ งานบริการในอนาคต
 - b. ได้ sample set ของผู้ป่วย ที่สามารถนำไปใช้ในงานวิจัยอื่นในอนาคต
 - c. ได้ model ของ molecules ที่ศึกษา เพื่อรองรับการนำยาต่อต้าน molecules เหล่านี้มาใช้ ในอนาคต
 - i. ไม่ได้ model ชัดเจน แต่ได้ทราบสัดส่วนของผู้ป่วยที่อาจจะนำ targeted therapy มาใช้ได้
 - d. ได้กลุ่มวิจัยทางด้านอนุพยาธิวิทยา และ เพิ่มทักษะการทำวิจัยแก่นักวิจัย
 - i. ได้จัดตั้งหน่วยพยาธิวิทยานรีเวชขึ้น ใน พ.ศ.2551 เพื่อมุ่งวิจัยทางด้าน มะเร็งปากมดลูก โดยประกอบด้วยอาจารย์ 4 คน และ ในขณะนี้ มี อาจารย์อีก 1 ท่านในหน่วยฯ ได้รับทุนวิจัยจาก สกว ให้ทำวิจัยเกี่ยวกับ มะเร็งปากมดลูกชนิด small cell carcinoma
3. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - a. เิงสาธารณะ มีเครือข่ายความร่วมมือ สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง
 - i. มีการสร้างเครือข่ายความร่วมมือในการทำวิจัยเกี่ยวกับมะเร็งปากมดลูก กับสถาบันวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ กับ ภาควิชา พยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
 - b. เิงวิชาการ มีการพัฒนาการเรียนการสอน สร้างนักวิจัยใหม่
 - i. จากผลการศึกษาที่ได้ ทำให้ได้ขยายขอบเขตไปศึกษาเกี่ยวกับ COX-2 expression ใน small cell carcinoma
4. อื่นๆ เช่นการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ **ดูภาคผนวก 2**
 - a. ได้เสนอผลงานแบบ poster presentation ในที่ประชุมทางวิชาการ “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว ครั้งที่ ” วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 ณ โรงแรมฮอลิเดย์อินน์

ธีรพันธ์ ธีรพันธ์ ปิชา ชะอำ เรื่อง Survivin, c-kit and c-erb-B2 expressions in
small cell carcinoma of the uterine cervix



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Survivin, c-kit and c-erbB-2 expression in small cell carcinoma of the uterine cervix

Kornkanok Sukpan^{1*}, Jongkolnee Settakorn¹, Surapan Khunamompong¹,
Chalong Cheewakriangkrai², Jatupol Srisomboon², Sumalee Siriaungkul¹

¹Gynecologic Pathology unit, Department of pathology, ²Gynecologic Oncology unit Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

* e-mail:kosukpan@med.cmu.ac.th

Objectives.

- To evaluate the expression of survivin, c-kit, and c-erbB-2 proteins in small cell carcinoma of the uterine cervix (SCCC).
- To evaluate the association between the protein expressions and the clinicopathologic features.

Materials and methods.

Seventy six cases of SCCC were retrieved from the pathology files at Chiang Mai University (1995-2007). The diagnosis of SCCC was based on histomorphologic criteria and positive IHC for at least two neuroendocrine markers (chromogranin A, synaptophysin, neuron specific enolase and CD56).

The following clinicopathologic features were recorded: age, clinical staging, depth of invasion, LVSI, parametrial invasion, lymph node metastasis, treatment, and clinical outcome.

One paraffin embeded tissue block of each patient was used for IHC studies. The primary antibodies included anti-survivin (Neomarker, polyclonal, 1:100), c-kit (Dakocytomation, polyclonal, 1:800) and c-erbB-2 (Dakocytomation, polyclonal, 1:800). Cases with $\geq 5\%$ positive tumor cells of moderate or strong intensity were regarded as positive staining.

Results:

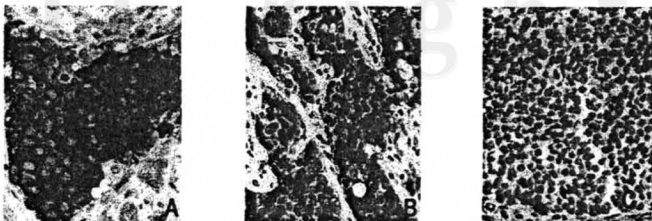
Among 76 SCCC cases (clinical stage IA1=3, 4.1%; IA2=3, 4.1 %; IB1=30, 41.1%; IB2=12, 16.4%; IIA=1, 1.4%; IIB=13, 17.8%; IIIA=2, 2.7%; IIIB=5, 6.8%; and IV=4, 5.5%), the mean patient age was 43.0 ± 9.4 years (27-72 years, median 42 years). The tumor size ranged from 1 up to 50 mm., median 20 mm. Depth of invasion included inner third=13, 37.1%; middle third=5, 14.3%; outer third=9, 25.7%, entire thickness=8, 22.9%).

The parameters that were significantly associated with tumor size included depth of invasion ($p=0.011$), parametrial involvement ($p=0.0005$), and LVSI ($p=0.0001$). Depth of invasion was positively associated with parametrial involvement ($p=0.007$) and LVSI ($p=0.024$). Only depth of invasion and parametrial involvement can predict lymph node metastasis ($p=0.044$ and $p=0.015$, respectively).

Table 1 demonstrated the expression of survivin, c-kit and c-erbB-2 in SCCC

Protein	survivin	c-kit	C-erbB-2
Negative	56	69	76
Positive	20 (26.3%)	7 (9.2%)	0(0%)

Picture 1 IHC for survivin (A), c-kit (B), and c-erbB-2 (C)



Survivin expression was associated with age ≤ 40 years ($p=0.003$) and early tumor stage, $< IIA$ ($p=0.049$). There was no significant association between the expression of the studied proteins and the extent of tumor growth, lymphovascular invasion, or lymph node metastasis.

Conclusions and discussions:

Only small proportion of SCCC showed expression of survivin and c-kit proteins and their expression did not correlate with tumor spread.

Survivin, an inhibitor of apoptosis protein, is highly expressed in majority of cancer including LSIL, HSIL and squamous cell carcinoma of cervix¹⁻², but there is no information about that in SCCC.

C-kit expression in tumors is much variable even in the group of neuroendocrine tumors³. C-kit expression in SCCC In this study was lower than those in the previous studies of Wang H and Lu D (6/22, 27%)⁴ and Ohwada M, et al (9/21, 43%)⁵, this might be related to the use of different antigen retrieval technique and concentration of the primary antibody.

The lack of c-erbB-2 expression in SCCC in this study was similar to that reported by Straughn M Jr, et al (0/16, 0%) but different from the study of Tangjitkamol S, et al (7/18, 38.9%) that used different company and concentration of the primary antibody⁶⁻⁷.

Therefore, the patients with SCCC are likely non-benefit from the currently available targeted therapy for these three proteins. In addition, the strong association between young age and tumoral survivin expression may reflect the difference in development of SCCC in young and old patient.

References:

1. Fukuda S, Pelus L. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther* 2006;5(5):1087-98
2. Li F, et al. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance. *Int J Cancer* 2005;114:509-12
3. Koch C, et al. Does the expression of c-kit(CD117) in neuroendocrine tumors represent a target for therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1073:517-26
4. Wang H, Lu D. Overexpression of c-kit protein is an infrequent event in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Modern Pathology* 2004;17:732-38
5. Ohwada M, et al. C-kit overexpression in neuroendocrine small cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006;27(1):53-5
6. Straughn M Jr, et al. Predictors of outcome in small cell carcinoma of the cervix- a case series. *Gynecology Oncology* 2001;83:216-20
7. Tangjitkamol S, et al. Expression of HER-2/neu, epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2, estrogen receptor and progesterone receptor in small cell and large cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: a clinicopathologic and prognostic study. *Int J Gynecol Cancer* 2005;15:646-56

Abbreviations:

SCCC = small cell carcinoma of the uterine cervix, IHC= immunohistochemical stain, LVSI = lymphovascular space invasion. LSIL = low grade squamous intraepithelial lesion, HSIL = high grade squamous intraepithelial lesion

Acknowledement:

This study was supported by The Thailand Research fund and The Faculty of Medicine, CMU. We would like to thank Mrs. Pacharee Utra for the data entering and Miss Lakkana Eianleng and Miss Thanwarat Chaithanswad for the laboratory work.

Expression of survivin, CD117, and C-erb-B2 in cervical neuroendocrine carcinoma

Kornkanok Sukpan, MD^a, Jongkolnee Settakorn, MD^a,
Surapan Khunamornpong, MD^a, Chalong Cheewakriangkrai, MD^b,
Jatupol Srisomboon, MD^b, Sumalee Siriaungkul, MD^a

^aDepartment of Pathology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,
Chiang Mai, Thailand

^bDepartment of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University,
Chiang Mai, Thailand

Address of Correspondence

Kornkanok Sukpan, MD
Department of Pathology, Faculty of Medicine,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200
Thailand
Tel. 66-0-5394-5442 ext. 105
Fax. 66-53-217144
e-mail address: kosukpan@med.cmu.ac.th

Abstract:

Background: Neuroendocrine carcinoma (NECA) of uterine cervix is a rare and aggressive cancer. In this study we evaluated the expression of survivin, CD117, and C-erb-B2 in 100 cases of cervical NECA to assess the possibility of using targeted therapy and their prognostic significance. **Methods:** Expression of survivin, CD117, and C-erb-B2 in cervical NECA were evaluated by immunohistochemical studies. The findings were correlated with clinicopathologic parameters and disease free survival using statistical analysis. **Results:** Among 100 cases, survivin, CD117, and C-erb-B2 expression were found in 27%, 12%, and 2% of cases, respectively. Survivin expression was significantly associated with younger age of the patients ($p=0.0325$). Disease recurrence was significantly correlated with deep stromal invasion ($p=0.039$), positive lymphovascular space invasion (LVSI) ($p=0.013$), and lymph node metastasis ($p=0.007$). Significant short disease free survival was observed in patients with early stage cancer ($p=0.037$), positive LVSI ($p=0.0131$), and lymph node metastasis ($p=0.0015$). Subgroup analysis in early stage cases with negative lymph node ($n=32$) showed that short disease free survival was significantly associated with positive survivin expression ($p=0.0405$). **Conclusion:** Survivin-targeted therapy may be applicable in cervical NECA and survivin immunoreactivity may be an additional prognostic marker for disease free survival.

Keyword: neuroendocrine carcinoma, small cell carcinoma, cervix, survivin, CD117, C-erb-B2

Neuroendocrine carcinoma (NECA) of uterine cervix is uncommon. It is classified into small cell carcinoma (SCCA) and large cell NECA (LCCA), based on histomorphologic criteria comparable to their counterpart in the lung. (1, 2) SCCA is much more common than the large cell type. NECA has an aggressive clinical behavior and unfavorable prognosis. Although a standard chemotherapeutic regimen for of cervical SCCA has been widely used, optimal treatment regimen with satisfactory outcome remains to be developed. Targeted treatment might be beneficial if the tumors expressed such particular molecule. Survivin, c-kit (CD117), and HER2/neu (C-erb-B2) are examples of potential therapeutic targets, probably in conjunction with standard chemotherapeutic agents. In addition, expression of these biomarkers has been shown to have some prognostic value.

Survivin is a member of inhibitor of apoptosis proteins that regulates cell division and apoptosis.(3) Antisurvivin therapy may help decrease proliferation and enhance apoptosis of cancer cells. Survivin expression is detected in many types of neoplasia whereas it is mostly absent in normal adult tissues, making survivin-targeted therapy an attractive approach of cancer treatment.(3) Expression of survivin in many types of cancers has been reported to be associated with unfavorable features such as high histologic grade, advanced tumor stage, resistance to treatment, or decreased survival.(3, 4) In the uterine cervix, survivin expression has been reported to be correlated with the severity of squamous lesion from high-grade squamous intraepithelial lesion to invasive squamous cell carcinoma and may be a potential prognostic marker of cervical cancer.(5-7) To our knowledge, survivin expression of cervical NECA and its significance has not been evaluated

CD117 is a transmembrane tyrosine kinase receptor, encoded by the c-kit proto-oncogene and typically expressed in gastrointestinal stromal tumor. Targeted therapy against c-kit protein (selective tyrosine kinase inhibitor STI571 or Imatinib mesylate) is now widely used. In pulmonary small cell carcinoma, CD117 expression has been reported in almost 70% of cases and the in vitro studies have suggested a potential therapeutic implication of tyrosine kinase inhibitor.(8, 9) Prognostic value of this marker was also reported in pulmonary SCCA.(10) Expression of CD117 in cervical SCCA has been evaluated in 2 previous studies, which reported variable expression rate from 27 to 43% based on 21-22 cases in each study.(11, 12) It is uncertain whether the expression of CD117 and its significance in cervical SCCA is similar or different from the pulmonary counterpart.

A cell surface protein C-erb-B2 functions as a growth factor receptor that is probably involved in the regulation of cell growth (13). C-erb-B2 expression has been reported in cervical carcinoma with potential prognostic significance, particularly in patients with cervical adenocarcinoma.(13-15) In pulmonary SCCA, the expression was reported in up to 30% of cases and may be associated with poor outcome.(16) Treatment with antibody to this protein (trastuzumab) might be useful in pulmonary SCCA.(16) C-erb-B2 expression of cervical SCCA or NECA have been reported in 2 studies comprising 16 and 24 cases, with expression rate of 0% (17) and 42% (18), respectively. As the previous results seem to be conflicting, an evaluation on the larger scale is needed.

In this study, we evaluated the immunohistochemical expression of survivin, CD117, and C-erb-B2 in a large number of cervical NECA to assess the likelihood for targeted therapy and their prognostic significance.

Materials and methods

This study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chiang Mai University. The cases of cervical NECA between January 1995 and December 2008 were retrieved from the surgical pathology files of the Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University. Clinical data were obtained by chart review. The slides of neoplastic tissue were reviewed. The diagnosis of NECA was based on the standard morphologic criteria (2) and the agreement of at least 2 pathologists. In addition to the typical

histologic features, the diagnosis of LCCA required a confirmation by positive immunoreaction for at least one neuroendocrine marker of the followings: chromogranin A (mouse monoclonal, clone DAG-A3, Glostrup, dilution 1:200), synaptophysin (mouse monoclonal, clone SY38, Dako cytometry, Glostrup dilution 1:50), CD56 (mouse monoclonal, clone 1B6, Novocastra laboratories, New castle, dilution 1:100), and neuron-specific enolase (mouse monoclonal, clone BBS/NC/VI-H14, Dako cytometry, Glostrup dilution 1:300). The clinical data and follow-up results were obtained from the chart review. Tumor staging was based on FIGO staging system.(1) The pathologic variables were recorded, including tumour size, histologic type, fraction of cervical stromal invasion, presence or absence of parametrial involvement, lymphovascular space invasion (LVSI), and lymph node metastasis. The presence of additional component of non-neuroendocrine neoplastic component was also recorded.

Immunohistochemistry: In each case, a representative formalin-fixed, paraffin-embedded tissue block containing neuroendocrine carcinoma was selected for immunohistochemical studies. Three micron sections were mounted on positively charged slides, heated in a microwave oven (survivin) or incubated in citrate buffer (Cd117 and c-erb-B2) for epitope retrieval, blocked for endogenous peroxidase, and incubated in 3% normal horse serum to reduce non-specific antibody binding. The primary antibodies to survivin (rabbit monoclonal, clone RB-9245, Neomarker, Fremont CA, dilution 1:100), CD117 (rabbit polyclonal, Dako cytometry, Glostrup, dilution 1:800), and c-erb-B2 (rabbit polyclonal, Dako cytometry, Glostrup, dilution 1:800) were applied for 1 hour at room temperature. Slides were then incubated for 30 minutes at room temperature with anti-rabbit IgG conjugated to a horseradish peroxidase-labelled polymer (Dako Envision system; Dako Corporation, Carpinteria, CA). Sections were then exposed to the chromogen 3-3'-diaminobenzidine for 10 minutes and counterstained with hematoxylin. Normal pancreas, gastrointestinal stromal tumor, and breast carcinoma was used as positive control and omission of the primary antibody as a negative control.

The evaluation of immunoexpression of each marker was separately assessed by two pathologists blinded to the clinicopathologic data. The immunoexpression was scored 'positive' when at least 5 % of neoplastic cells showed staining of at least moderate intensity. In cases with disagreement of the expression, a consensus was reached after reviewing the slides together.

Statistical analysis: The clinicopathologic data were summarized and analyzed using Intercooled Stata 8.0. Correlation of variables was evaluated by the Chi squared test, Fisher's exact test, or t-test, as appropriate. Multivariate analysis was performed by logistic regression in a backward stepwise fashion. Association between the study factors and disease free survival were estimated by Kaplan-Meier survival curve and log-rank test for equality of survivor functions. Then, the factors with p value of greater than 0.25 were analyzed together by multivariate cox-regression method. A result was considered to be statistically significant when the p value was less than 0.05.

Results

Among 100 cases, the patients' mean age was 44.76 ± 11.48 years (median 42.5 years, range 25-80 years). There were 3 patients with stage IA1, 3 with stage IA2, 33 with stage IB1, 16 with stage IB2, 1 with stage IIA, 20 with stage IIB, 2 with stage IIIA, 12 with stage IIIB, 6 with stage IVB, and 4 with unknown stage. The tumor size ranged from 1 to 55 mm with median of 30 mm (mean 25.08 ± 15.07 mm). Survivin, CD117, and C-erb-B2 were positive in 27, 12, and 2 cases, respectively. The characteristics of the patients were shown in table 1.

The mean age of the survivin negative group (46.25 ± 10.72 years) was significantly greater than that of the positive group (40.74 ± 12.68 years, $p=0.0325$).

There were also positive correlation between the patients' age vs clinical stage ($p=0.0122$); positive parametrial status vs positive LVSI ($p=0.039^f$), depth of stromal invasion ($p=0.002$), and tumor size ($p=0.046$); positive LVSI vs depth of stromal invasion ($p=0.005$) and tumor size ($p<0.0001$); and depth of stromal invasion vs tumor size ($p=0.0001$). Lymph node metastasis was associated with positive parametrial status ($p=0.001$) and depth of stromal invasion ($p=0.027$). (data not shown)

No significant association between c-kit and the other parameters was observed. Analysis for CD117 expression was not done because the number of positive cases was too small.

Table 2 displayed the association between clinicopathologic parameters and disease recurrence. Patients with recurrent disease had significantly greater proportion of cases with deep stromal invasion (75% vs 42.86%, $p=0.039$), positive LVSI (93.75% vs 58.62%, $p=0.013$), and lymph node metastasis (37.50% vs 3.70%, $p=0.007$) than those without recurrence. Only LVSI ($p=0.032$) and lymph node metastasis ($p=0.016$) were independent prognostic factors for disease recurrence. Kaplan-Meier survival estimate and log-rank test for equality of survivor functions showed short time to recurrence in patients with early stage cancer ($p=0.037$), positive LVSI ($p=0.0131$), and lymph node metastasis ($p=0.0015$). However, only lymph node metastasis independently predicted short disease free survival ($p=0.009$, hazard ratio=5.62, 95%CI=1.53-20.71).

Follow up status was available in 69 out of 100 patients, including 49 (87.5%) of 56 early stage cases (I-IIA) and 20 (50.0%) of 40 advance stage cases (\geq IIB). As failure treatment and loss of follow up are common in advanced stage patients, we further analyzed the associated between disease recurrence and the studied factors in early stage cases (Table 3). Among 49 patients, tumor recurrence was significantly associated with deep stromal invasion ($p=0.028$), positive LVSI ($p=0.031$), and lymph node metastasis ($p=0.005$). Only LVSI ($p=0.036$) and lymph node metastasis ($p=0.012$) were independent prognostic factors for predicting disease recurrence. However, survivin positivity was marginally associated with disease recurrence ($p=0.056$) in multivariate analysis. Kaplan-Meier curve and log-rank test demonstrated that large cell NECA ($p=0.0354$), deep stromal invasion ($p=0.0293$), positive LVSI ($p=0.0178$), and lymph node metastasis ($p=0.0004$) were significantly associated with short disease free survival. But, only lymph node metastasis was independently correlated with short disease free survival ($p=0.003$, hazard ratio=48.64, 95%CI=3.76-629.61).

As lymph node status was the potent predictive factor for disease recurrence, we further analyzed the association within the low risk to recurrent group, i.e. early stage cases without lymph node metastasis ($n=32$). In these patients, no significant association was seen between the study factors and disease recurrence (Table 4). However, multivariate analysis demonstrated that LVSI ($p=0.047$) and large cell NE type ($p<0.0001$) were independent prognostic factor for disease recurrence. Survivin positivity was also marginally associated with disease recurrence ($p=0.081$) in multivariate analysis. The recurrent rate for survivin positive cases was 40% (6 of 15) comparing to 11.76% (2 of 17) of survivin negative cases. Among these 32 cases, short disease free survival was significantly associated with positive survivin expression ($p=0.0405$) (Figure 2). However, multivariate Cox-regression analysis showed no significant association between any study factors and disease free survival.

Discussion

NECA of the cervix has a more aggressive clinical course than the usual types of cervical carcinoma. The rate of recurrence in early stage SCCA is higher than other histologic types, despite postoperative adjuvant therapy.(19) To our knowledge, this study included the largest number of cervical NECA for evaluating the immunoeexpression of three potential biomarkers for targeted therapy; survivin, CD117, and C-erb-B2. Among these, survivin seems to be the most potential one. Furthermore, the findings of our study suggested that the immunoeexpression of these biomarkers in cervical SCCA are different from the pulmonary counterpart, probably due to some biologic and etiologic differences (12), such as the patients' age group, the cells of origin, the association with HPV infection, or other factors.

The mechanism that survivin regulates proliferation of malignant cells has not been clearly understood (3). In addition to the anti-apoptotic activity, survivin may have an important role in endothelial cell integrity and angiogenesis.(3) Prognostic value of survivin expression has been evaluated in various types of cancers. Many studies demonstrated the association of survivin expression and unfavorable clinical outcome.(3, 4) Immunoeexpression of survivin may be localized within the nucleus or the cytoplasm and different localization could be associated with histologic type or organ of origin of cancer.(3, 4) Nuclear survivin expression may promote cell proliferation whereas cytoplasmic expression may increase cell survival.(4) Al though many studies reported only nuclear expression of survivin as a predictor of poor prognosis (3, 7, 20), the prognostic significance of cytoplasmic expression of survivin was also observed in several reports (21-24).

Information of survivin expression in NECA is limited. In pulmonary SCCA, survivin expression was reported in 75 % of cases (27 of 36).(25) In Merkel cell carcinoma, which is considered as NECA of the skin, survivin expression was detected in all 19 cases studied.(20) Nuclear survivin expression was observed in 57.9% (11 of 19) of cases and was related with poor clinical outcome.(20) The rate of survivin expression in cervical NECA in our study (27%) was lower than that of neuroendocrine carcinoma of the other sites.

In cervical squamous cell carcinoma, survivin expression was associated with poor overall survival in advanced stage.(7) To date, survivin expression of cervical NECA has not been investigated. Although survivin expression may be increased with tumor progression in cervical squamous cell carcinoma (6, 7), survivin expression in cervical NECA tended to be inversely associated with the extent of tumor spread in our study. Survivin expression was more frequent in early stage tumor than advanced stage cases. This finding suggested that the role of survivin may be confined to the early development of cervical NECA with only limited function in tumor expansion and progression. In our study, survivin was predominantly localized within the cytoplasm, which was similar to the finding in a study on cervical squamous cell carcinoma.(26)

In the absence of lymph node metastasis at the diagnosis, early stage tumors with survivin expression had a higher recurrence rate (40.0% versus 11.8%, $p=0.106$) and shorter disease-free survival ($p=0.0405$), compared to those without expression. Although all but one recurrent cases of early stage tumors without nodal metastasis had LVSI (Table 4); the association of survivin with decreased disease-free survival could not be explained by the presence of LVSI alone because survivin expression was not associated with LVSI. Hence, we postulated that survivin expression in early-stage tumors may facilitate the survival and progression of the remnant neoplastic cells. Further study with larger number would help to clarify the prognostic significance of this protein in early stage NECA of the cervix.

Expression of CD117 is frequent in pulmonary SCCA.(12) Wang and Lu reported CD117 expression in 27.27% (6 of 22 cases) of cervical SCCA, but the staining was rather

focal and weak.(12) However, Ohwada et al reported a higher rate of expression up to 42.86% (9 of 21 cases) and suggested that Imatinib therapy may be considered in cervical SCCA.(11) Based on the result in our study CD117, this targeted treatment was non-applicable in the majority of cases (12.00%). In addition, CD117 expression did not have any prognostic value.

C-erb-B2 expression was reported to be a poor predictor in patients with cervical adenocarcinoma.(14, 15) At least one fourth of cervical adenocarcinoma showed C-erb-B2 overexpression by the current criteria.(14, 15), and anti-HER-2 therapy may be potentially useful. In pulmonary SCCA, C-erb-B2 expression was reported in 7 to 30% of cases and may be associated with short survival (16). Only few studies on C-erb-B2 expression of cervical NECA have been reported. Straughn et al (17) reported the absence of C-erb-B2 expression in all 16 cases of cervical SCCA, whereas Tangjitkamol et al (18) reported Her2 expression in 41.7% of 24 NECA (18 SCCA and 6 LCCA). However, the latter study interpreted cytoplasmic expression as a positive reaction, and all positive cases had cytoplasmic expression with focal membrane staining (<5% cells) being observed in only 2 of 24 cases (8.3%). The rarity of C-erb-B2 expression in our study was, thus, in keeping with the previous results. Treatment with anti-HER-2 (Herceptin) is likely non-beneficial in the setting of cervical NECA.

In conclusion, survivin-targeted therapy may be beneficial in cervical NECA, whereas the therapies against c-kit, and HER-2 molecules may have limited role. Moreover, survivin immunoreactivity may be used as additional prognostic marker for disease free survival.

References

1. Tavassoli FA, Deville P (eds). World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press, 2003.
2. Albores-Saavedra J, Gersell D, Gilks CB, Henson DE, Lindberg G, Santiago H, et al. Terminology of endocrine tumors of the uterine cervix: results of a workshop sponsored by the College of American Pathologists and the National Cancer Institute. *Arch Pathol Lab Med.* 1997 Jan;121(1):34-9.
3. Fukuda S, Pelus LM. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther.* 2006 May;5(5):1087-98.
4. Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer.* 2005 Apr 20;114(4):509-12.
5. Tan GC, Norlatiffah S, Sharifah NA, Razmin G, Shiran MS, Hatta AZ, et al. Immunohistochemical study of p16 INK4A and survivin expressions in cervical squamous neoplasm. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010 Jan-Mar;53(1):1-6.
6. Lee JP, Chang KH, Han JH, Ryu HS. Survivin, a novel anti-apoptosis inhibitor, expression in uterine cervical cancer and relationship with prognostic factors. *Int J Gynecol Cancer.* 2005 Jan-Feb;15(1):113-9.
7. Bache M, Holzapfel D, Kappler M, Holzhausen HJ, Taubert H, Dunst J, et al. Survivin protein expression and hypoxia in advanced cervical carcinoma of patients treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol.* 2007 Jan;104(1):139-44.
8. Krystal GW, Honsawek S, Litz J, Buchdunger E. The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth. *Clin Cancer Res.* 2000 Aug;6(8):3319-26.
9. Wang WL, Healy ME, Sattler M, Verma S, Lin J, Maulik G, et al. Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer cell lines by the novel tyrosine kinase inhibitor STI 571. *Oncogene.* 2000 Jul 20;19(31):3521-8.
10. Micke P, Basrai M, Faldum A, Bittinger F, Ronnstrand L, Blaukat A, et al. Characterization of c-kit expression in small cell lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *Clin Cancer Res.* 2003 Jan;9(1):188-94.
11. Ohwada M, Wada T, Saga Y, Tsunoda S, Jobo T, Kuramoto H, et al. C-kit overexpression in neuroendocrine small cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2006;27(1):53-5.
12. Wang HL, Lu DW. Overexpression of c-kit protein is an infrequent event in small cell carcinomas of the uterine cervix. *Mod Pathol.* 2004 Jun;17(6):732-8.
13. Nishioka T, West CM, Gupta N, Wilks DP, Hendry JH, Davidson SE, et al. Prognostic significance of c-erbB-2 protein expression in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1999;125(2):96-100.
14. Kihana T, Tsuda H, Teshima S, Nomoto K, Tsugane S, Sonoda T, et al. Prognostic significance of the overexpression of c-erbB-2 protein in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer.* 1994 Jan 1;73(1):148-53.
15. Mandai M, Konishi I, Koshiyama M, Komatsu T, Yamamoto S, Nanbu K, et al. Altered expression of nm23-H1 and c-erbB-2 proteins have prognostic significance in adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer.* 1995 May 15;75(10):2523-9.
16. Potti A, Willardson J, Forseen C, Kishor Ganti A, Koch M, Hebert B, et al. Predictive role of HER-2/neu overexpression and clinical features at initial presentation in patients with extensive stage small cell lung carcinoma. *Lung Cancer.* 2002 Jun;36(3):257-61.

17. Straughn JM, Jr., Richter HE, Conner MG, Meleth S, Barnes MN. Predictors of outcome in small cell carcinoma of the cervix--a case series. *Gynecol Oncol.* 2001 Nov;83(2):216-20.
18. Tangjitgamol S, Ramirez PT, Sun CC, See HT, Jhingran A, Kavanagh JJ, et al. Expression of HER-2/neu, epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2, estrogen receptor, and progesterone receptor in small cell and large cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: a clinicopathologic and prognostic study. *Int J Gynecol Cancer.* 2005 Jul-Aug;15(4):646-56.
19. Lee JM, Lee KB, Nam JH, Ryu SY, Bae DS, Park JT, et al. Prognostic factors in FIGO stage IB-IIA small cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix treated surgically: results of a multi-center retrospective Korean study. *Ann Oncol.* 2008 Feb;19(2):321-6.
20. Kim J, McNiff JM. Nuclear expression of survivin portends a poor prognosis in Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2008 Jun;21(6):764-9.
21. Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Rubini C, Mariggio MA, et al. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2003 Dec 15;89(12):2244-8.
22. Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, et al. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients. *Surgery.* 2004 Aug;136(2):443-8.
23. Preuss SF, Weinell A, Molitor M, Stenner M, Semrau R, Drebber U, et al. Nuclear survivin expression is associated with HPV-independent carcinogenesis and is an indicator of poor prognosis in oropharyngeal cancer. *Br J Cancer.* 2008 Feb 12;98(3):627-32.
24. Takeno S, Yamashita S, Takahashi Y, Ono K, Kamei M, Moroga T, et al. Survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma: its prognostic impact and splice variant expression. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010 Feb;37(2):440-5.
25. Chen G, Wang X, Liu Y, Wang L, Yanf H, Duan H. Expressions of FEZ1 and Survivin and their significance in small cell lung cancer and squamous cell lung carcinoma. *Chinese-German J Clin Oncol.* 2008;7(4):207-9.
26. Frost M, Jarboe EA, Orlicky D, Gianani R, Thompson LC, Enomoto T, et al. Immunohistochemical localization of survivin in benign cervical mucosa, cervical dysplasia, and invasive squamous cell carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2002 May;117(5):738-44.

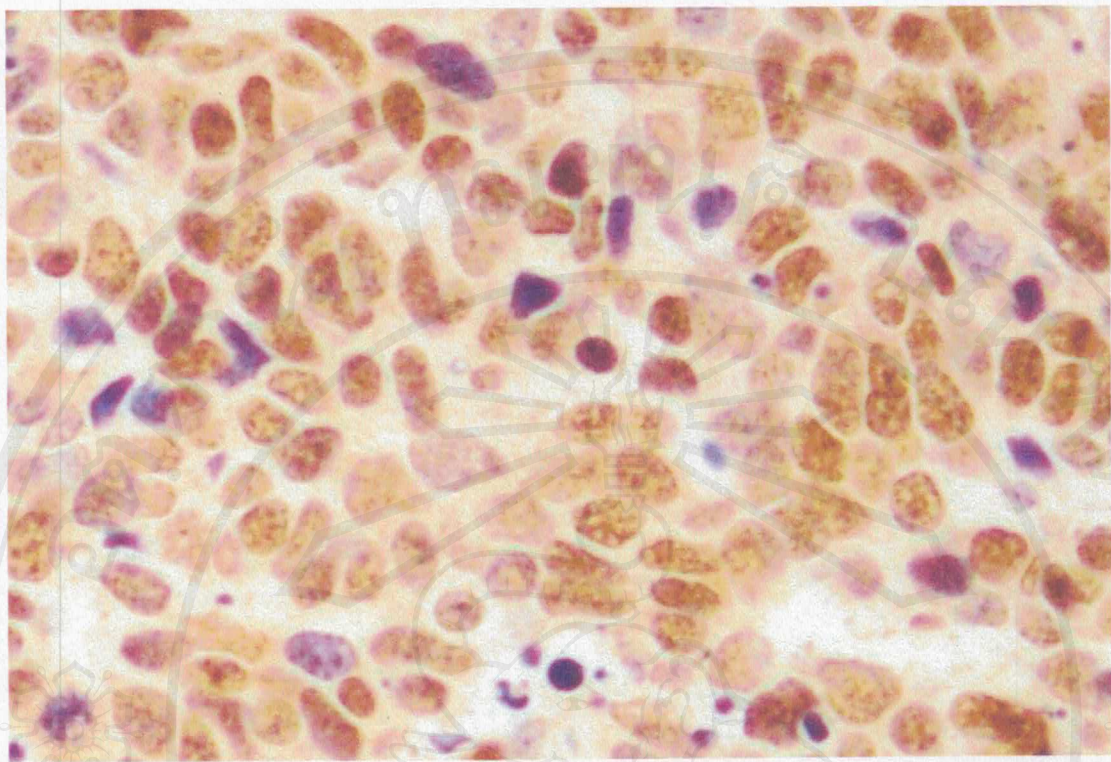


Figure 1

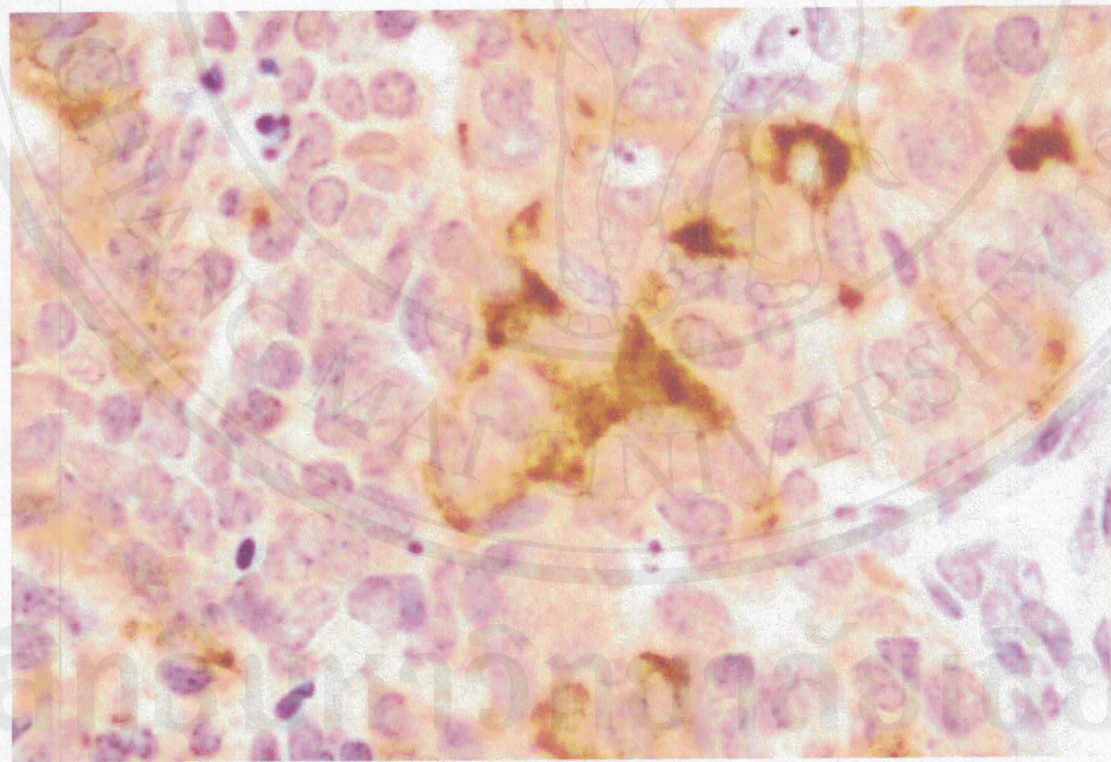


Figure 2

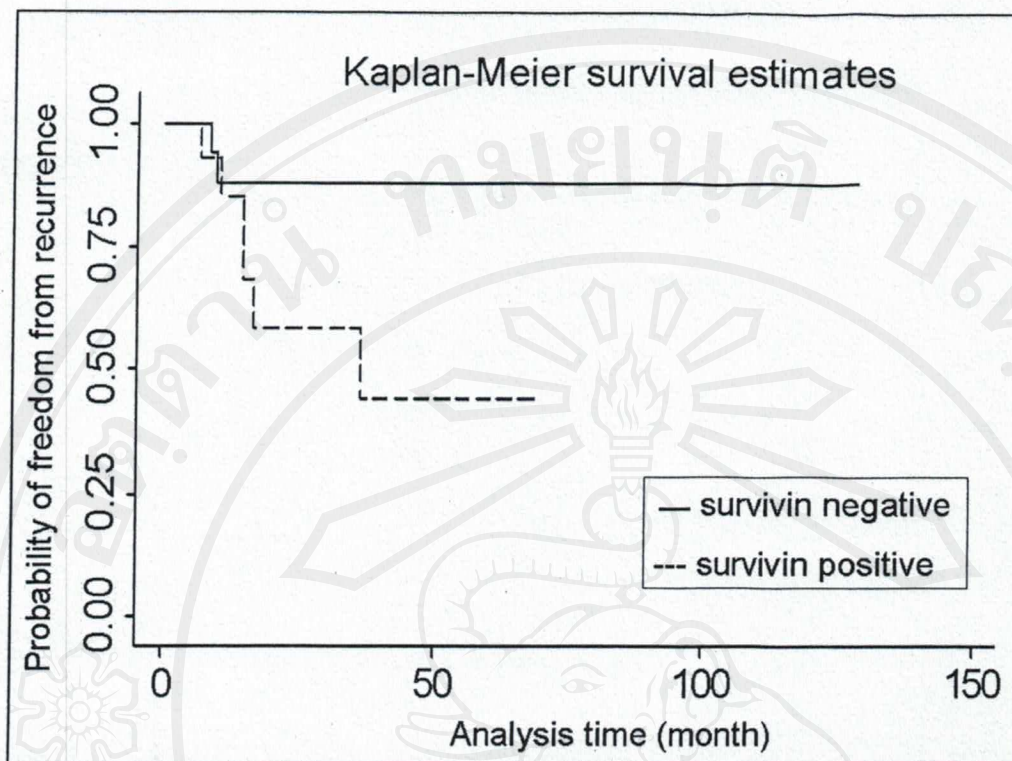


Figure 3

Legends

Figure1 Survivin expression (nuclear staining) in cervical neuroendocrine carcinoma

Figure2 Survivin expression (cytoplasmic staining) in cervical neuroendocrine carcinoma

Figure3 Kaplan-Meier plot demonstrates disease free survival in patient with survivin negative and survivin positive neuroendocrine carcinoma.

Table 1: Characteristics of the patients with cervical NECA

Parameters	Total n (%)	Survivin- n (%)	Survivin+ n (%)	P value
Total	100 (100.00)	73 (73.00)	27 (27.00)	
Age				
≤40 years	39 (39.00)	21 (28.77)	18 (66.67)	0.001 ^{c*}
>40 years	61 (61.00)	52 (71.23)	9 (33.33)	
Stage				
≤IIA	56 (58.33)	37 (52.86)	19 (73.08)	0.074 ^c
>IIA	40 (41.67)	33 (47.14)	7 (26.92)	
Histologic type				
- small cell	95 (95.00)	71 (97.26)	24 (88.89)	0.120 ^f
- large cell	5 (5.00)	2 (2.74)	3 (11.11)	
Tumor size				
≤4 cm	38 (82.61)	23 (82.14)	15 (83.33)	1.000 ^f
>4 cm	8 (17.39)	5 (17.86)	3 (16.67)	
Depth of invasion				
- inner/middle third	20 (44.44)	13 (48.15)	7 (38.89)	0.540 ^c
> middle third	25 (55.56)	14 (51.85)	11 (61.11)	
LVSI				
- negative	13 (28.26)	8 (28.57)	5 (27.78)	0.953 ^c
- positive	33 (71.74)	20 (71.43)	13 (72.22)	
Parametrial status				
- negative	34 (79.07)	20 (76.92)	14 (82.35)	1.000 ^f
- positive	9 (20.93)	6 (23.08)	3 (17.65)	
Lymph node				
- negative	37 (84.09)	21 (77.78)	16 (94.12)	0.220 ^f
- positive	7 (15.91)	6 (22.22)	1 (5.88)	
Recurrence				
- negative	40 (56.34)	25 (54.35)	15 (60.00)	0.646 ^c
- positive	31 (43.66)	21 (45.65)	10 (40.00)	
CD117				
- negative	88 (88.00)	66 (90.41)	22 (81.48)	0.297 ^f
- positive	12 (12.00)	7 (9.59)	5 (18.52)	

NECA=neuroendocrine carcinoma, LVSI=lymphovascular space invasion

Table 2: Correlation between disease recurrence and clinicopathologic parameters in NECA

Parameters	No recur n (%)	Recur n (%)	P value
Total	40 (56.34)	31 (43.66)	
Age			
≤40 years	17 (42.50)	10 (32.26)	0.378 ^c
>40 years	23 (57.50)	21 (67.74)	
Stage			
≤IIA	31 (77.50)	20 (64.52)	0.228 ^c
>IIA	9 (22.50)	11 (35.48)	
Histologic type			
- small cell	37 (92.50)	27 (93.55)	1.000 ^f
- large cell	3 (7.50)	2 (6.45)	
Tumor size			
≤4 cm	24 (82.76)	13 (81.25)	1.000 ^f
>4 cm	5 (17.24)	3 (18.75)	
Depth of invasion			
- inner/middle third	16 (57.14)	4 (25.00)	0.039 ^{c*}
> middle third	12 (42.86)	12 (75.00)	
LVSI			
- negative	12 (41.38)	1 (6.25)	0.013 ^{c*}
- positive	17 (58.62)	15 (93.75)	
Parametrial status			
- negative	22 (84.62)	11 (68.75)	0.265 ^f
- positive	4 (15.38)	5 (31.25)	
Lymph node			
- negative	26 (96.30)	10 (62.50)	0.007 ^{f*}
- positive	1 (3.70)	6 (37.50)	
Survivin			
- negative	25 (62.50)	21 (67.74)	0.646 ^c
- positive	15 (37.50)	10 (32.26)	
CD117			
- negative	34 (84.00)	26 (83.87)	1.000 ^f
- positive	6 (15.00)	5 (16.13)	

Table 3: Correlation between disease recurrence and clinicopathologic parameters in early stage NECA

Parameters		No recur n (%)	Recur n (%)	P value
Total		29 (59.18)	20 (40.82)	
Age	≤40 years	15 (51.72)	8 (40.00)	0.419 ^c
	>40 years	14 (48.28)	12 (60.00)	
Histologic type	- small cell	28 (96.55)	18 (90.00)	0.559 ^f
	- large cell	1 (3.45)	2 (10.00)	
Tumor size	≤4 cm	23 (85.19)	11 (78.57)	0.673 ^f
	>4 cm	4 (14.81)	3 (21.43)	
Depth of invasion	- inner/middle third	15 (57.69)	3 (21.43)	0.028 ^{c*}
	> middle third	11 (42.31)	11 (78.57)	
LVSI	- negative	12 (44.44)	1 (7.14)	0.031 ^f
	- positive	15 (55.56)	13 (92.86)	
Parametrial status	- negative	20 (83.33)	9 (64.29)	0.245 ^f
	- positive	4 (16.67)	5 (35.71)	
Lymph node	- negative	24 (96.00)	8 (57.14)	0.005 ^f
	- positive	1 (4.00)	6 (42.86)	
Survivin	- negative	19 (65.52)	12 (60.00)	0.694 ^c
	- positive	10 (34.48)	8 (40.00)	
CD117	- negative	24 (82.76)	17 (85.00)	1.000 ^f
	- positive	5 (17.24)	3 (15.00)	

Table 4: Correlation between disease recurrence and clinicopathologic parameters in early stage, lymph node negative NECA

Parameters		No recur n (%)	Recur n (%)	P value
Total		24 (75.00)	8 (25.00)	
Age	≤40 years	13 (54.17)	4 (50.00)	1.000 ^f
	>40 years	11 (45.83)	4 (50.00)	
Histologic type	- small cell	23 (95.83)	7 (87.50)	0.444 ^f
	- large cell	1 (4.17)	1 (12.50)	
Tumor size	≤4 cm	20 (83.33)	7 (87.50)	1.000 ^f
	>4 cm	4 (16.67)	1 (12.50)	
Depth of invasion	- inner/middle third	14 (58.33)	3 (37.50)	0.423 ^f
	> middle third	11 (41.67)	5 (62.50)	
LVSI	- negative	12 (50.00)	1 (12.50)	0.101 ^f
	- positive	12 (50.00)	7 (87.50)	
Parametrial status	- negative	20 (83.33)	8 (100.00)	0.550 ^f
	- positive	4 (16.67)	0 (0.00)	
Survivin	- negative	15 (62.50)	2 (25.00)	0.106 ^f
	- positive	9 (37.50)	6 (75.00)	
CD117	- negative	19 (79.17)	6 (75.00)	1.000 ^f
	- positive	5 (20.83)	2 (25.00)	