

DNA flæðigreining eykur nákvæmni við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein

Sunna Guðlaugsdóttir^{1,2}, Helgi Sigurðsson¹, Bjarni A. Agnarsson³, Jón G. Jónasson³, Sigrún Kristjánsdóttir³, Guðjón Baldursson¹, Sigurður Björnsson^{1,4}, Þórarinn Sveinsson¹, Valgarður Egilsson³

Guðlaugsdóttir S, Sigurðsson H, Agnarsson BA, Jónasson JG, Kristjánsdóttir S, Baldursson G, Björnsson S, Sveinsson P, Egilsson V

DNA flow cytometry is a useful prognostic guide in the treatment of breast cancer

Læknablaðið 1995; 81: 138–47

It is widely agreed that the presence or absence of axillary lymph-node involvement (N) is the most reliable predictor of relapse or survival in breast cancer, together with tumor size (T) and the presence or absence of distant metastasis (M). These prognostic factors are the cornerstones of the TNM staging system. The aim of the present study was to ascertain, in all patients diagnosed with invasive primary breast cancer in Iceland during the years 1981–84 (n=347), whether flow cytometric DNA analysis of ploidy status and fraction of cells in the S-phase contribute prognostic information, additional to that obtained with TNM staging variables. Paraffin fixed tumor material was available from 340 patients (98%) and DNA ploidy and S-phase fraction was assessed with flow cytometry. DNA ploidy could be analysed in 98% of tumor samples (n=334), of which 114 (34%) were diploid and 220 (66%) non-diploid. S-phase fraction could be analysed in 97% of the tumor samples (n=329), the median S-phase value was 7.0%, and was higher in non-diploid than diploid tumors ($p < 0.0001$, 9.3% vs. 2.7%).

Median duration of patient follow-up was 7.5 years. The disease-free survival at that point of time was 15% higher in patients with diploid tumors than non-diploid ones ($p = 0.004$, 69% vs 54%). Similar survival comparison in relation to S-phase fraction

was 30% when the median S-phase value was used as cut-off point ($p < 0.0001$, S-phase < 7.0% being 74% vs. S-phase $\geq 7.0\%$ being 44%).

Multivariate analyses with regard to breast cancer survival and disease-free survival, which included both ploidy status and S-phase categories adjusting for age, tumor size and lymph node involvement, showed the S-phase value categories to be independent prognostic variables ($p < 0.0001$). Patients with high S-phase tumors had a three-fold higher risk of recurrence than patients with low S-phase tumors. Ploidy status was not an independent prognostic variable, if however the S-phase categories were excluded from analysis, ploidy status was on the borderline of being an independent variable ($p = 0.09$). In node-negative patients the S-phase fraction was the only useful variable in determining prognosis.

We conclude that the S-phase value is a useful prognostic guide for the clinician and will be used for this purpose in the treatment of breast cancer in Iceland.

Ágrip

TNM stígur er notað við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein, en hún endurspeglar útbreiðslu sjúkdómsins við greiningu, það er æxlisstærð (T), eitlameinvörp (N) og fjarmeinvörp (M). Tilgangur rannsóknarinnar var að athuga hvort auka mætti nákvæmni við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein með því að bæta við TNM stígurina upplýsingum um líffræðilega þætti, það er að segja DNA innihald æxlisfrumna og hlutfall þeirra í framleiðslufasa eða S-fasa.

Rannsóknin tekur til allra kvenna sem greindust með ífarandi brjóstakrabbamein á Íslandi á árunum 1981–84 (n=347). Frá 340 (98%) þeirra voru til formálin hert paraffín innsteypt vefjasýni, en DNA innihald þeirra og S-fasi voru metin með flæðigreini (flow cytometer).

Frá ¹krabbameinslækningadeild Landspítalans, ²lyfjadeild Borgarspítalans, ³Rannsóknastofu Háskólans í meinafræði, ⁴lyfjadeild Landakotsspítala. Fyrirspurnir og bréfaskipti: Helgi Sigurðsson, krabbameinslækningadeild Landspítalans, 101 Reykjavík.

DNA innihald var hægt að meta í um 98% sýnanna ($n=334$), þar af voru 114 (34%) með eðlilegt DNA innihald eða tvílitna (diploid) en 220 (66%) með óeðlilegt DNA innihald eða mislitna (aneuploid/non-diploid). S-fasa mælingar var hægt að framkvæma á 329 sýnum (97%). Fjöldi frumna í S-fasa var marktækt hærri ($p<0,0001$) í mislitna ælum (9,3%) en tvílitna (2,7%). Miðgildi frumna í S-fasa var 7,0%.

Líkur á sjúkdómslausu lífi í sjö og hálf t ár voru um 15% hærri hjá sjúklingum með tvílitna en mislitna æli ($p=0,004$, 69% á móti 54%). Hliðstæður samanburður á sjúklingum með lágt (<7,0%) og hátt ($\geq 7,0\%$) S-fasa hlutfall æxlisfrumna sýndi 30% mun á lífslíkum (74% á móti 44%, $p<0,0001$).

Stuðst var við fjölþátta reiknilíkan (Cox proportional hazard model) við mat á horfum sjúklinganna og gaf S-fasinn tölfraðilega marktækar upplýsingar um horfur umfram þættina í TNM stigun ($p=0,0002$). Um þrefalt meiri líkur voru á því að sjúkdómurinn tæki sig upp aftur hjá sjúklingum með há S-fasa æli miðað við sjúklinga með lág S-fasa æli. DNA innihald hafði ekki marktæka þýðingu nema S-fasa mælingum væri sleppt úr reiknilíkaninu, en þá reyndist DNA staða vera á mörkum þess að vera sjálfstæður áhættuþáttur ($p=0,09$). Hjá sjúklingum með eitlaneikvæðan sjúkdóm reyndist S-fasinn eini þátturinn, sem hafði marktæka þýðingu við mat á horfum ($p=0,0009$).

Niðurstöður þessar sýna að mælingar á S-fasa hlutfalli æxlisfrumna með flæðigreini auka nákvæmni við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein.

Inngangur

Tíðni brjóstakrabbameins hefur farið vaxandi hér (1) sem í öðrum vestrænum ríkjum (2) og er nú algengasta krabbamein hjá íslenskum konum (3). Nýgengi er um 80 á 100.000 (3) og um 8% allra kvenna mega búast við sjúkdómnum fyrir áttætt (4). Sjúkdómurinn er algengasta dánarorsök kvenna á aldrinum 35–59 ára (upplýsingar frá Hagstofu Íslands 1993), en í heildina þriðja algengasta dánarorsökin á eftir hjarta- og æðasjúkdómum og lungnakrabbameini. Brjóstakrabbamein er því eitt alvarlegasta heilsuvandamál íslenskra kvenna í dag og er brýnt að stuðla að framförum til að koma í veg fyrir sjúkdóminn og bæta meðferð.

Gangur sjúkdómsins er breytilegur. Sumar konur lækna við einfalda skurðaðgerð þar sem frumæxlið er fjarlægð, en aðrar með að því er virðist sambærilegan sjúkdóm (miðað við TNM stigun) fá síðar staðbundið endurmeið (recidive) eða fjarmeinvörp (5), en þegar fjarmeinvörp eru til staðar telst sjúkdómurinn nánast ólæknandi.

Markmiðið með mati á horfum sjúklinga er að geta greint þá sem muni lækna við skurðaðgerð og koma þannig í veg fyrir ofmeðhöndlun með lyfja- og/eða geislameðferð. TNM stigun er notuð við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein, en í þeirri stigun vegur þyngst hvort meinvörp eru í holhandareitlum. Til einföldunar er sjúklingum oft skipt niður í tvo hópa, það er með eitlaneikvæðan- eða eitlajakvæðan sjúkdóm, en sjúkdómurinn tekur sig upp aftur hjá um 25–30% sjúklinga með eitlaneikvæðan sjúkdóm borið saman við 70–75% hjá þeim með eitlajakvæðan sjúkdóm (6). Viðbótarmeðferð eftir skurðaðgerð (adjuvant therapy) með frumudrepani lyfjum eða hormónalyfjum er hefðbundin hjá sjúklingum með eitlajakvæðan sjúkdóm og aukast lífslíkur þeirra þá um fimmtung (7). Lífslíkur sjúklinga án eitlameinvarpa hafa hins vegar verið álitnar það góðar að viðbótarmeðferð væri óþörf (6).

Á síðustu misserum hefur því verið haldið fram að nánast allar konur er fá brjóstakrabbamein beri að meðhöndla með krabbameins- og/eða hormónalyfjum í framhaldi skurðaðgerðar. Heilbrigðisyfirvöld í Bandaríkjunum hafa til dæmis mælt til þess að konur með eitlaneikvæðan sjúkdóm fái slíka viðbótarmeðferð (8), en aðrir hafa lagst gegn því og bent á að þar með væri verið að ofmeðhöndla um 70–75% kvenna sem greinast með eitlaneikvæðan sjúkdóm (9,10).

Því hefur verið haldið fram að æxlisfrumur sérhvers ælis séu eins og óráðin krossgáta þar sem frumukjarnarnir innihalda allar þær upplýsingar sem eru nauðsynlegar til að sjá fyrir líklegan framgang sjúkdómsins (5). Með því að geta í eyðurnar, til dæmis með rannsóknnum á þáttum eins og hormónaviðtökum, DNA innihaldi, S-fasa og æxlislitningum, þá ætti að vera hægt að sjá fyrir líklegan gang sjúkdómsins með meiri nákvæmni en þeirri sem fæst með TNM stigun (5,11). Þannig mætti veita hnitmiðaðri meðferð í byrjun og koma í veg fyrir bæði of- og vanmeðhöndlun.

Estrógen viðtakar (ER), prógesterón við-

takar (PgR), DNA innihald og hlutfall frumna í S-fasa eru á meðal þeirra líffræðilegu þátta æxlisfrumna brjóstakrabbameins sem mest eru rannsakaðir til að kanna horfur sjúklinga (6). Rannsóknir sýna að estrógen og prógesterón viðtakar hafa forspárgildi um næmi sjúkdómsins fyrir hormónameðferð (12). Þær veita einnig nokkrar upplýsingar um sjúkdómshorfur, en þó það takmarkaðar að vafasamt er að þær komi að notum einar og sér (12). S-fasi mældur með geislasmælingu (radiography) eftir tímíðin merkingu frumna gefur sjálfstæðar upplýsingar um sjúkdómshorfur (13). Myndgreining (image cytophotometry) eftir DNA Feulgen litun gefur upplýsingar um DNA innihald æxla og hefur verið sýnt fram á að sjúklingar með brjóstakrabbamein sem hafa eðlilegt DNA innihald eða tvílitna (diploid) æxli hafa betri horfur en þeir sem hafa óeðlilegt DNA innihald eða mislitna (aneuploid/non-diploid) æxli (14). Með flæðigreiningu (flow cytometry) fást samtímis upplýsingar um DNA stöðu og S-fasa hlutfall. Margar rannsóknir hafa sýnt að S-fasa hlutfall æxlisfrumna gefur tölfraðilega marktækar upplýsingar um horfur sjúklinga óháð öðrum þáttum, þar með talin TNM stigun (10,15–19), en aðrir hafa þó ekki getað staðfest þessar niðurstöður (20). Flestar rannsóknir sýna að DNA innihald æxla gefur sambærilegar en þó minni upplýsingar um horfur og S-fasa hlutfallið (10,15–19).

Tilgangur rannsóknarinnar var að athuga hvort DNA innihald og S-fasa hlutfall æxlisfrumna gefi upplýsingar um horfur umfram TNM stigun og jafnframt hvort þær auki nákvæmni við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein.

Efniviður og aðferðir

Rannsóknin nær til kvenna sem greindust með brjóstakrabbamein á Íslandi á árunum 1981–84. Upplýsingar um útbreiðslu sjúkdómsins við greiningu (TNM stigun), meðferð og afdrif sjúklinga voru fengnar úr sjúkraskrá. Upplýsingar um hormónaviðtaka (ER og PgR) fengust hjá frumulíffræðideild Rannsóknastofu Háskólans í meinafræði. Á Rannsóknastofu Háskólans í meinafræði eru varðveitt paraffín innsteypt vefjasýni frá þeim sjúklingum sem gengist hafa undir skurðaðgerð vegna sjúkdómsins. Mælingar á DNA innihaldi æxlanna voru framkvæmdar með flæðigreini (flow cytometer) sem er sameign Rannsóknastofu

Háskólans í meinafræði og krabbameinslækn-ingadeildar Landspítalans. Gagnasöfnun var framkvæmd án vitneskju um niðurstöður flæðigreiningar og öfugt (tvíblint).

Sjúklingar: Heildarfjöldi sjúklinga með brjóstakrabbamein á árunum 1981–84 var 367, en rannsóknin takmarkaðist við þá sjúklinga sem greindust í lifanda lífi með ífarandi brjóstakrabbamein. Tuttugu konur voru ekki teknar með í rannsóknina af eftirfarandi ástæðum; tíu höfðu forstigsbreytingar án ífarandi æxlisvaxtar (carcinoma in-situ), sex reyndust vera með meinvarp frá áður greindu brjóstakrabbameini, þrjár höfðu greinst erlendis og ein greindist við krufningu. Sjúklingafjöldi í rannsókninni var því 347. Þar af voru fimm sjúklingar sem höfðu einnig greinst með annað frumæxli og látist af völdum krabbameins, án þess að hægt væri að staðfesta hvort frumæxlið væri dánarorsökin og voru þeir því útilokaðir frá rannsóknnum til að meta lífslíkur.

Skurðaðgerð á þessu tímabili var oftast fólgin í brotnámi brjósts og holhandarstigun (n=292, 84%). Fleygskurður (n=15) eða aðrar skurðaðgerðir (n=33) voru framkvæmdar mun sjaldnar (14%). Sjö sjúklingar með sjúkdóm á háu stigi gengust ekki undir skurðaðgerð (2%), hjá fjórum þeirra byggðist sjúkdómsgreining á fínálarfrumusýni en hjá þremur á klínískri greiningu. Vefjasýni 340 sjúklinga lágu því fyrir.

Eftirfarandi krabbameinslyfjameðferð var gefin eftir skurðaðgerð: Eitt hundrað og sex konur fengu eingöngu sex daga CMFV lyfjameðferð (cyklófosfamíð (C), metótrexati (M), 5-flúoróúrasíl (F) og vinkristín (V)), 77 konur fengu CMF lyfjameðferð í níu mánuði auk sex daga lyfjameðferðarinnar, 34 konur fengu sambærilega CMF meðferð án þess að fá sex daga lyfjameðferðina. Tamoxifen eftirmeðferð fengu 123 konur, en hún var venjulega gefin í eitt ár, ýmist ein og sér eða í tengslum við aðra meðferð. Eitt hundrað konur fengu geislameðferð og fór meðferðin eftir útbreiðslu frumæxlis og eitlameinvarpa og var yfirleitt gefin ásamt annarri meðferð. Áttatíu og átta konur fengu enga eftirmeðferð.

TNM stigun var byggð á vefjafræðilegri og klínískri stigun (21), en vefjafræðileg stigun réð væri hún til staðar. Minniháttar breyting var gerð á TNM flokkun, þannig að sjúklingar með eitlaneikvæðan sjúkdóm og æxlisstærð 20–80

mm (T2–3N0) voru flokkaðir sem stig IIa, sjúklingar með eitlajakvæðan sjúkdóm og æxlisstærð 50 mm eða minni sem stig IIb (T1–2N1), sjúklingar með staðbundinn útbreiddan sjúkdóm sem stig III (T3N1–2 eða T4 eða N2–3) og sjúklingar með fjarmeinvörp sem stig IV (M1). Sjúklingum var skipt í 10 ára aldursflokka eftir aldri við greiningu. Stuðst var við hefðbundin viðmiðunargildi þegar sjúklingum var skipt niður í áhættuhópa eftir þáttunum: Aldur: yngri en 50 ára eða 50 ára og eldri; æxlisstærð: 20 mm eða minna eða meira en 20 mm; eitlastaða eftir meinafræðilegri stigun (n=278): eitlaneikvæðir eða eitlajakvæðir. Sjúklingum var einnig skipt niður í eitlaneikvæða (stig I og IIa) og eitlajakvæða (stig IIb og III) eftir TNM stigun (n=309) og þá tekið mið af klínískri stigun ef upplýsingar vantaði um eitlameinvörp við meinafræðilega stigun.

Mæling hormónaviðtaka: Ef brjóstakrabbameinssýni berst ferskt til Rannsóknastofu Háskólans í meinafræði, er tekið sýni úr æxlinu til rannsókna á hormónaviðtökum. Sýnin eru varðveitt fryst við -70°C þar til hormónaviðtakamæling er framkvæmd. Mælingar á estrógen og prógesterón viðtökum voru framkvæmdar með því að nota geislamerkt estrógen og prógesterón (ligand binding assay) (22). Viðmiðunargildi við mat á horfum var 10 femtomól/mg eggjahvítu vegna estrógen viðtaka (<10 á móti ≥ 10) og 25 femtomól/mg vegna prógesterón viðtaka (<25 á móti ≥ 25).

Mæling DNA innihalds með flæðigreiningu: Meinafræðingar fóru yfir öll æxli í þessari rannsókn til að tryggja að DNA mælingin væri framkvæmd á æxlisvef. Jafnframt fór fram vefjafræðileg endurskoðun á öllum sýnum og lagt var mat á vefjafræðilega þætti eins og kirtilsérhæfingu, kjarnasérhæfingu og fjölda frumudeilinga (niðurstöður ekki sýndar). DNA innihald var mælt með FACscan flæðigreini (Becton-Dickinson) eftir að frumurnar höfðu verið sérstaklega meðhöndlaðar og litaðar með própídíum jöði (23,24). Mælingin var framkvæmd á að minnsta kosti 15.000 frumukjörnum og voru samsettir frumukjarnar flokkaðir í burtu með því að nota hlið sem takmarkar úrlestur við ákveðna frumukjarnastærð.

Flokkun á DNA innihaldi var unnin eftir hefðbundnum aðferðum (25), þar sem einstofna æxli með tilliti til DNA innihalds eru tvílitna, en fjölstofna æxli eru mislitna. S-fasa

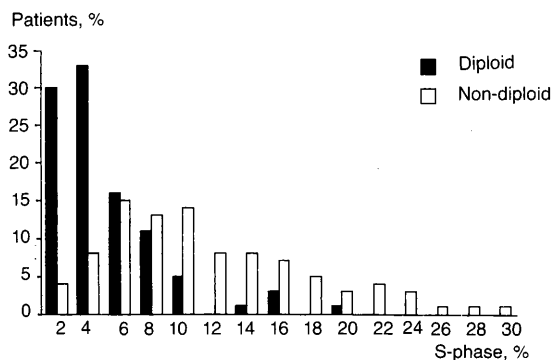


Fig. 1. Distribution of diploid and non-diploid tumors in relation to the fraction of cells in the S-phase compartment of the cell cycle.

hlutfall var reiknað með ferhyrnings nálgun (26) á tvenns konar hátt (RFIT og SOBR), en niðurstöður SOBR nálgunar eru sýndar á mynd 1. Sjúklingunum var skipt í tvo áhættuhópa eftir miðtölugildi S-fasans ($<7,0\%$ á móti $\geq 7,0\%$).

Tölfræði: Tengsl á milli einstakra þátta, sem voru meðhöndlaðir sem samfelld gildi (continuous variable), voru könnuð með Spearman prófi (Rs). Mann-Whitney U-próf var notað ef þættirnir voru flokkaðir í tvo flokka (categories) og Kruskal Wallis próf væri um fleiri en tvo flokka að ræða.

Líftími sjúklinga var reiknaður í árum frá greiningardegi að tveimur skilgreindum endapunktum. Annars vegar er um líftíma án sjúkdóms að ræða og er þar miðað við hvort sjúkdómurinn tók sig upp aftur sem staðbundið mein og/eda sem fjarmeinvörp. Hins vegar er um líftíma með brjóstakrabbameini að ræða en þá er miðað við dauða vegna sjúkdóms á háu stigi, án þess að mat sé lagt á dánarorsök. Við uppgjör voru allir sjúklingar taldir með þegar miðað var við líftíma með brjóstakrabbameini, en sjúklingar með fjarmeinvörp við greiningu voru ekki taldir með í útreikningum þegar miðað var við líftíma án sjúkdóms.

Líftímakúrfur voru gerðar með Kaplan og Meier aðferð (27) og tölfræðilegur mismunur á milli líftímakúrfa var metinn með logrank prófi (28). Við mat á horfum sjúklinga var Cox sam-anburðaráhættu líkanið (proportional hazard model) notað við fjölþátta mat (multivariate analysis) á sjálfstæðu gildi einstakra þátta (29).

Table I. Correlation (Rs) between prognostic variables.

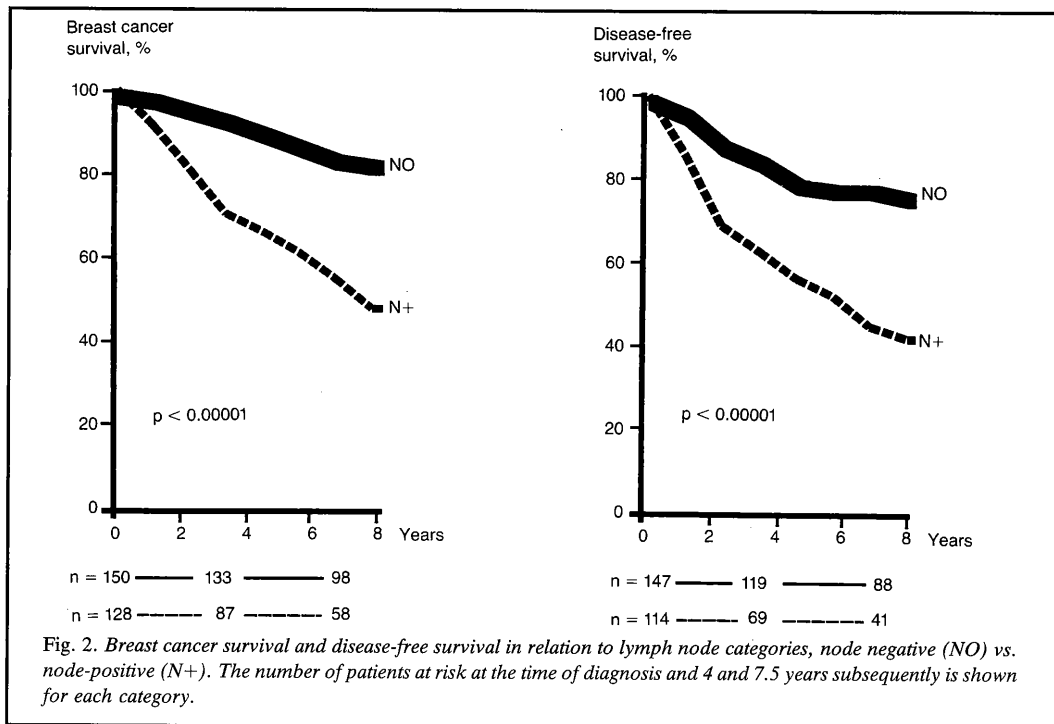
Prognostic variable	DNA-ploidy* (n=334)		S-phase (n=329)	
	Rs	p-value	Rs	p-value
Age (n=334)	-0.10	0.03	-0.20	0.002
Tumor size (n=334)	-0.01	0.82	0.10	0.04
Axillary lymph nodes (n=278)	0.05	0.38	0.09	0.16
TNM stage** (n=334)	0.09	0.06	0.10	0.01
Estrogen receptor (n=173)	-0.08	0.93	-0.20	0.004
Progesterone receptor (n=152)	-0.07	0.42	-0.20	0.01
S-phase (n=329)	0.70	<0.001	—	—

* Diploid=1 and non-diploid=2

** Stage; I=1, IIa=2, IIb=3, III=4, IV=5

Table II. Breast cancer and disease-free survival in relation to prognostic variables at 7.5 years of follow-up.

Prognostic variable	Number of patients (%)		Breast cancer-survival (%)	Disease-free survival (%)
Age, years			p=0.01	p=0.02
<40	25	(7)	37	52
40-<49	64	(19)	70	79
50-<59	66	(19)	51	66
60-<69	80	(23)	62	72
70-<79	54	(16)	62	66
≥80	55	(16)	70	72
Age categories			p=0.20	p=0.39
<50 years	89	(26)	71	61
≥50 years	255	(74)	67	58
Tumor size			p=0.0002	p=0.004
≤20 mm	155	(45)	77	65
>20 mm	187	(55)	61	55
Axillary lymph node status			p<0.0001	p<0.0001
Node-negative	150	(54)	85	77
Node-positive	128	(46)	55	40
TNM stage			p<0.0001	p<0.0001
I (T1N0)	99	(29)	89	82
IIa (T2-3N0)	91	(27)	84	77
IIb (T1-2N1)	101	(30)	63	50
III (T3N1,T4 og N2-3)	18	(5)	21	21
IV (M1)	31	(9)	9	—
Estrogen receptor content			p=0.04	=0.07
<10 fmol/mg protein	53	(31)	58	45
≥10 fmol/mg protein	117	(69)	71	57
Progesterone receptor content			p=0.02	p=0.03
<10 fmol/mg protein	73	(49)	60	47
≥10 fmol/mg protein	76	(51)	75	67
DNA ploidy status			p=0.008	p=0.004
Diploid	110	(33)	77	69
Non-diploid	219	(67)	64	54
S-phase fraction			p<0.0001	p<0.0001
<7.0%	160	(49)	82	74
≥7.0%	164	(51)	55	44



Niðurstöður

Miðtölutímalengd eftirlits var 7,5 ár (0–12 ár). Miðtölualdur við greiningu var 62 ár (27–94 ár). Miðtöluæxlisstærð við greiningu var 25 mm (5–180 mm) og fjöldi skoðaðra eitla var átta að meðaltali (0–50).

Hægt var að mæla DNA innihald í 334 (98%) og S-fasa mælingar í 329 (97%) af þeim 340 sýnum sem voru fyrir hendi. Þar af voru 114 tvílitna (33%) og 220 mislitna (67%). Miðtölugildi S-fasa frumna var 7,0%, í tvílitna æxlum 2,9% (0,6–19,5) og 9,3% í mislitna æxlum (1–40,8), sem er marktækur munur ($p < 0,0001$).

Samband DNA innihalds og S-fasa við aðra þætti: Öfugt samband var á milli aldurs og DNA innihalds (tafla I). Hjá sjúklingum yngri en 50 ára voru 25% æsla tvílitna, en 36% hjá sjúklingum 50 ára og eldri ($p = 0,05$). Annars var ekki marktækt samband á milli DNA innihalds og annarra þátta, að S-fasanum undanskildum (tafla I). Öfugt samband var einnig á milli S-fasa og aldurs (tafla I). Hjá sjúklingum yngri en 50 ára voru 53% æsla með lágan S-fasa (<7,0%) en 39% hjá þeim sem voru 50 ára og eldri ($p = 0,01$). Marktækt samband var á milli S-fasa og æxlisstærðar, eitlameinvarpa og TNM stigunar (tafla I). Hjá sjúklingum með eitlaneikvæðan sjúkdóm höfðu 55% æsla lágan

S-fasa (<7,0%), en 41% hjá þeim sem voru með eitlajákvæðan sjúkdóm ($p = 0,01$). Öfug tengsl voru á milli S-fasa og hormónaviðtaka (tafla I). Þannig höfðu 62% estrógen viðtaka jákvæðra æsla og 24% estrógen viðtaka neikvæðra æsla lágan S-fasa (<7,0%) ($p = 0,01$).

Mat á horfum: Líftími 344 sjúklinga var rannsakaður. Við uppgjör var 141 sjúklingur á líffi án sjúkdóms (41%), 69 sjúklingar (20%) höfðu látist án þess að hafa merki um virkt krabbamein, 107 sjúklingar (31%) höfðu látist með fjarmeinvörp, 11 sjúklingar (3%) voru á líffi með fjarmeinvörp og 16 sjúklingar (5%) voru á líffi eftir að hafa fengið staðbundin endurmeiri án merkis um fjarmeinvörp. Upplýsingar varðandi líftíma sjúklinga og dreifingu hinna ýmsu þátta eru birtar í töflu II.

Konur sem voru á aldrinum 40–50 ára við greiningu sjúkdómsins, hafa betri horfur en bæði yngri ($p = 0,02$) og eldri konur ($p = 0,005$), en væri konunum skipt á hefðbundinn hátt í hópa yngri eða eldri en 50 ára var líftími beggja hópa sambærilegur (tafla II). Flestir þættir sem rannsakaðir voru höfðu tölfraðilega marktæk áhrif á horfur, en eitlastaða í holhandareitlum og S-fasinn höfðu þó greinilega bestu upplausnina (tafla II). Mynd 2 sýnir mismun á

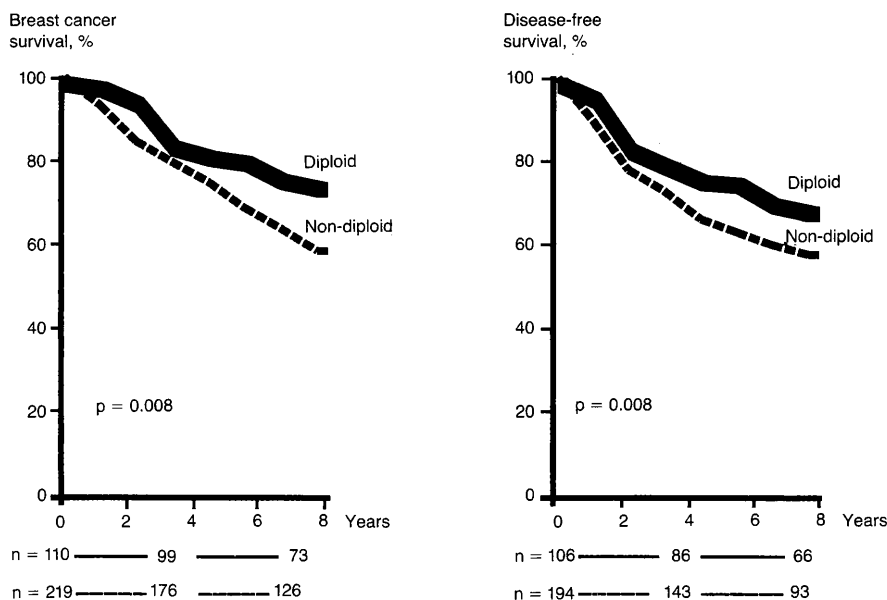


Fig. 3. Breast cancer survival and disease-free survival in relation to DNA ploidy categories, diploid vs. non-diploid. The number of patients at risk at the time of diagnosis and 4 and 7.5 years subsequently is shown for each category.

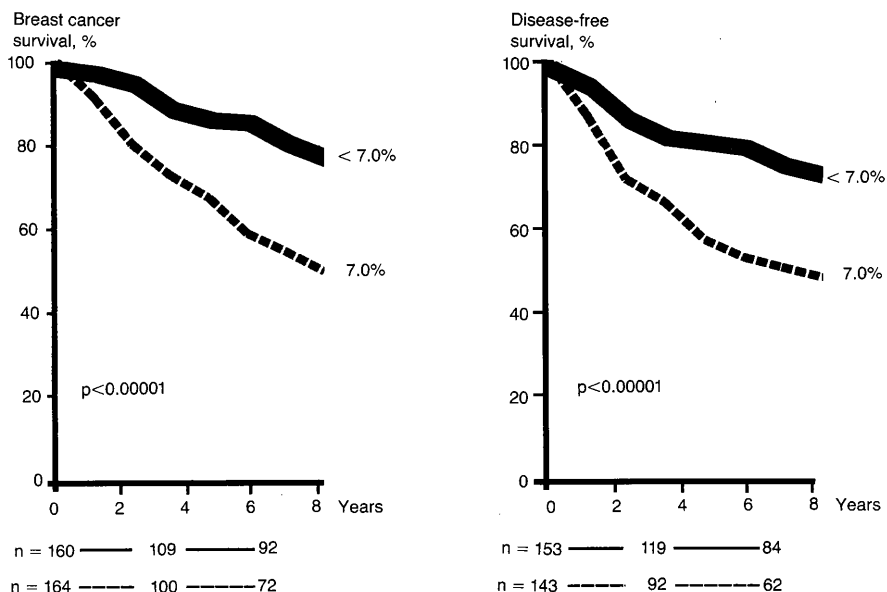


Fig. 4. Breast cancer survival and disease-free survival in relation to S-phase categories with the median S-phase value applied for cut-off – i.e., <7.0% vs. ≥7.0%. The number of patients at risk at the time of diagnosis and 4 and 7.5 years subsequently is shown for each category.

líftíma (Kaplan-Meier) vegna eitlastöðu í holhandareitlum, mynd 3 vegna DNA innihalds og mynd 4 vegna S-fasa.

Cox líkanið fyrir samanburðaráhættu var notað við mat á sjálfstæðu gildi þeirra þátta er

rannsóknin náði yfir við mat á horfum. Eitlastaða í holhönd og S-fasi voru þeir þættir sem mest vægi höfðu (tafla III). Óháð öðrum þáttum, höfðu sjúklingar með eitlajakvæðan sjúkdóm um þrefalda áhættu á því að sjúkdómur-

Table III. Multivariate analysis (Cox proportional hazard regression) of prognostic variables of survival, with death due to disease and disease relapse as end-points.

	Breast cancer survival (n=324)			Disease-free survival (n=295)		
	RR*	Range	p-value	RR*	Range	p-value
Age**	1.50	(0.95–2.35)	0.07	1.10	(0.70–1.65)	0.72
Tumor size***	1.80	(1.20–2.70)	0.005	1.25	(0.80–1.80)	0.32
Lymph-node status****	4.10	(2.60–6.45)	<0.0001	3.15	(2.20–4.45)	<0.0001
DNA-ploidy#	0.90	(0.50–1.50)	0.74	0.80	(0.45–1.30)	0.61
S-phase##	2.95	(1.75–4.90)	<0.0001	2.60	(1.55–4.35)	0.0002

* Relative risk

** <50 years vs. ≥50 years

*** >20mm vs. ≤20mm

**** Node-positive vs. node-negative

Non-diploid vs. diploid

≥7.0% vs. <7.0%

Table IV. Multivariate analysis (Cox proportional hazard regression) of prognostic variables of survival, with death due to disease and disease relapse as end-points, in patients with node-negative disease.

	Breast cancer survival (n=178)			Disease-free survival (n=178)		
	RR*	Range	p-value	RR*	Range	p-value
Age**	2.25	(0.90– 5.80)	0.09	1.85	(0.85–4.00)	0.13
Tumor size***	1.50	(0.65– 3.35)	0.33	1.25	(0.65–2.45)	0.52
DNA-ploidy#	1.75	(0.55– 5.55)	0.34	1.85	(0.85–4.50)	0.18
S-phase##	6.70	(2.15–20.85)	0.001	3.30	(1.45–7.35)	0.0004

* Relative risk

** <50 years vs. ≥50 years

*** >20mm vs. ≤20mm

Non-diploid vs. diploid

≥7.0% vs. <7.0%

inn tæki sig upp aftur miðað við sjúklinga með eitlaneikvæðan sjúkdóm (tafla III). Sambærilegar niðurstöður fengust þegar sjúklingar með hátt hlutfall S-fasa frumna (≥7,0%) voru bornir saman við sjúklinga með lágt hlutfall S-fasa frumna (<7,0%) (tafla III). Æxlisstærð var einnig sjálfstæður áhættuþáttur við mat á lífslíkum sjúklinga með brjóstakrabbamein en ekki við mat á sjúkdómslausu lífi. Væri miðað við 50 ára aldursmörk við greiningu, hafði aldur ekki marktæka þýðingu (tafla III). Væru sjúklingar á aldrinum 40–50 ára hins vegar bornir saman við aðra aldurs hópa, höfðu þeir marktækt betri horfur óháð öðrum þáttum ($p=0,04$) (tafla III). DNA innihald hafði hins vegar ekki marktæk áhrif á horfur, en væri S-fasa sleppt úr líkaninu fyrir samanburðar-áhættu, reyndist DNA innihald vera á mörkum þess að hafa sjálfstæða þýðingu ($p=0,09$).

Hormónaviðtakar höfðu marktæk áhrif á horfur við einþátta rannsóknir á líftíma (tafla II), en þegar tekið var tillit til annarra þátta þá höfðu þeir ekki marktæk áhrif. Þær niðurstöður eru ekki sýndar þar sem upplýsingar um hormónaviðtaka vantaði hjá meira en helmingi sjúklinga.

Hjá sjúklingum með eitlaneikvæðan sjúk-

dóm, samkvæmt vefjafræðilegri og/eða klínískri TNM stigun, sýndu DNA innihald ($p=0,02$) og S-fasinn ($p=0,0001$) marktækan mun á líftíma. Líkanið fyrir samanburðar-áhættu sýndi hins vegar að S-fasinn var eini sjálfstæði áhættuþátturinn fyrir þennan undirhóp sjúklinga (tafla IV).

Þrjátíu og níu sjúklingar voru með mjög lítil æxli (<15 mm) án eitlameinvarpa og var ekki með vissu hægt að meta hvort mæling á DNA innihaldi yki á nákvæmni við mat á horfum þeirra. Greinileg vísbending var þó fyrir hendi hvað varðar S-fasa gildin, sjúkdómurinn hafði tekið sig upp aftur hjá 11% sjúklinga (3/26) með lág S-fasa æxli og hjá 46% sjúklinga (6/13) með há S-fasa æxli ($p=0,07$).

Umráða

Niðurstöður okkar sýna að S-fasinn er þáttur sem hefur sjálfstætt gildi við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein, óháð aldri þeirra við greiningu, æxlisstærð, eitlastöðu, hormónaviðtökum og DNA innihaldi æxlanna. Þetta er í samræmi við niðurstöður annarra rannsókna (10,15–19)

Það eykur gildi rannsóknarinnar að hún nær til allra sjúklinga sem greindust á Íslandi á

árunum sem rannsóknin tekur til og DNA mælingar voru framkvæmdar hjá 96% þeirra. Aðrar sambærilegar rannsóknir ná yfirleitt til takmarkaðra hópa sjúklinga og DNA mælingar hafa þegar best lætur aðeins verið framkvæmdar hjá um 50% þeirra (30).

Þegar metið er hvort nýr þáttur hafi áhrif á horfur sjúklinga, er mikilvægt að kanna hvort tengsl séu á milli þessa nýja þáttar og þeirra þátta sem áður hafa verið notaðir við slíkt mat (31). Það er athyglisvert að tölfræðilega marktæk tengsl voru á milli S-fasans og allra þeirra þátta sem áður hafa verið notaðir til viðmiðunar við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein (tafla I). Engu að síður gefur S-fasinn tölfræðilega marktækari viðbótarupplýsingar um horfur (tafla III og IV).

Veikleiki við flæðigreiningu æxla er sá að rannsóknin er ekki sértæk fyrir æxlisfrumur þar sem bæði frumuhlutum (cell debris) og ýmsum öðrum frumum er blandað saman við æxlisfrumurnar (bandvefs-, kirtil-, blóð- og bólgufrumum). Í mislitna æxlum byggir S-fasa mælingin að mestu á æxlisfrumum, nema þegar DNA innihaldið er aðeins óverulega frábrugðið því tvílitna (near-diploid). Tvílitna æxli eru yfirleitt með lágan S-fasa en hann mælist vafalaust lægri en hann er í raun og veru, þar sem æxlisfrumur blandast eðlilegum frumum. Þrátt fyrir þennan veikleika við S-fasa mælingarnar gefa þær marktækari viðbótarupplýsingar um horfur umfram TNM stigun.

Konur á aldrinum 40–50 ára við greiningu sjúkdómsins höfðu betri horfur en yngri og eldri konur, og er þetta í samræmi við stóra faraldsrannsókn sem unnin var af Höst og Lund í Noregi (32), en það hefur verið útbreiddur misskilningur að horfur sjúklinga yngri en 50 ára séu verri en þeirra sem eru eldri en 50 ára. Konur yngri en 40 ára höfðu hins vegar verstar horfur í þessari rannsókn og er það einnig í samræmi við niðurstöðurnar frá Noregi (32).

Það er umdeilt hvaða viðmiðunargildi eigi að nota fyrir S-fasann við mat á horfum, en flestir nota miðtölugildið (33). S-fasinn er líffræðilegur þáttur sem endurspeglar hversu hratt æxlisfrumur skipta sér og er eðlilegt að slíkar upplýsingar geti komið að notum við mat á horfum sjúklinga. Hins vegar er hætt við að upplýsingar um horfur glattist þegar sjúklingum er einfaldlega skipt eftir miðtölugildi í tvo áhættuhópa (34). Fleiri viðmiðunargildi vegna

S-fasans voru skoðuð án þess að unnt reyndist að sýna fram á betri upplýsingar um líftíma sjúklinganna og af þeim sökum var ákveðið að nota hið hefðbundna miðtölugildi.

Margir sjúklinganna höfðu fengið meðferð með hormóna- og/eða krabbameinslyfjum, en slík meðferð hefur áhrif á horfur (7). Ekki var þó tekið tillit til meðferðar í fjölþátta rannsóknunum, en slík viðmiðun var þó framkvæmd og virtist meðferð sjúklinganna ekki hafa marktæk áhrif á niðurstöður. Þessar niðurstöður eru þó ekki sýndar þar sem önnur rannsókn fer nú fram á áhrifum lyfjameðferðar á batahorfur sjúklinga með brjóstakrabbamein.

Hlutfall sjúklinga sem eru með lítil æxli og eitlameikvæðan sjúkdóm mun aukast þar sem skipulögð krabbameinsleit með röntgenmyndatöku brjósta greinir sjúkdóminn fyrr en ella. Kallioniemi og félagar hafa sýnt fram á að lítil brjóstakrabbamein án eitlameinvarpa sem greinast við fyrstu umferð í skipulagðri krabbameinsleit hafa tilhneigingu til betri líffræðilegrar hegðunar en sambærileg æxli sem greinast á hefðbundinn hátt (34). Þannig gæti kerfisbundin leit stuðlað óbeint að ofmedhöndlun sjúklinga ef ekki er tekið tillit til líffræðilegra þátta við ákvarðanatöku um meðferð. Í þessari rannsókn hins vegar voru eingöngu 39 sjúklingar með mjög lítil æxli (<15 mm) án eitlameinvarpa. Ekki var með vissu hægt að meta hvort mæling á DNA innihaldi eykur nákvæmni við mat á horfum þeirra, en þó var greinileg vísbinding í þá átt hvað varðar S-fasa gildin. Sjúkdómurinn hafði tekið sig upp aftur hjá 11% sjúklinga með lág S-fasa æxli en hjá 46% sjúklinga með há S-fasa æxli. Þessar niðurstöður benda til þess að flæðigreining geti komið að notum við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein sem greinast við krabbameinsleit. Þegar er búið að DNA mæla æxli frá meira en 400 sjúklingum á Íslandi sem greinst hafa með brjóstakrabbamein frá árinu 1987, þegar leit að brjóstakrabbameini hófst með röntgenmyndatöku. Á næstu mánuðum verður kannað nánar hvort líffræðileg hegðun æxla sem greindust árin 1987–90 sé önnur en þeirra sem greindust á árunum 1981–84. Ennfremur verður metið frekar hvort DNA mælingar koma að notum við mat á horfum sjúklinga með mjög lítil æxli án eitlameinvarpa.

DNA innihald æxlis og S-fasa hlutfall er nú haft til viðmiðunar við mat á horfum sjúklinga með brjóstakrabbamein hér á landi.

Þakkir

Verkefnið naut styrkja úr Vísindasjóði Íslands, rannsóknasjóði Krabbameinsfélags Íslands og starfslaunasjóði sjúkráhuslækna.

Starfsfólki eftirfarandi deilda er þakkað samstarf og velvilji við gagnasöfnun: Krabbameinslækningadeildar Landspítalans, Rannsóknastofu Háskólans í meinafræði, Krabbameinsskrár Krabbameinsfélags Íslands, Tölvuvers Landspítalans og skurðeilda Landspítala, Borgarspítala, Landakotsspítala, Fjórðungssjúkráhusins á Akureyri og Sjúkráhus Akraness.

HEIMILDIR

1. Tulinius H, Bjarnason O, Sigvaldason H, Bjarnadóttir G, Ólafsdóttir G. Tumors in Iceland. 10. Malignant tumors of the female breast. A histological classification, laterality, survival and epidemiological consideration. *APMIS* 1988; 96: 229-38.
2. Glass AG, Hoover RN. Rising incidence of breast cancer: relationship to stage and receptor status. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 693-6.
3. Skýrsla 1993, Krabbameinsfélagið. Lögð fram á aðalfundi Krabbameinsfélags Íslands 28. maí 1992. Reykjavík: Krabbameinsfélagið, 1993: 24-36.
4. Ragnarsson J. Þriðji til fjórði hver Íslendingur fær krabbamein fyrir áttætt. *Heilbrigðismál* 1992; 40: 5.
5. Blamey R. Does biological understanding influence surgical practice? *Br J Cancer* 1989; 60: 271-4.
6. McGuire WL, Tandon AK, Allred DC, Chamness GC, Clark GM. How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 1006-14.
7. Early Breast Cancer, Trialists Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. 133 randomised trials involving 31000 recurrences and 24000 deaths among 75000 women. *Lancet* 1992; 339: 1-15, 71-85.
8. Clinical alert from the National Cancer Institute. *Breast Cancer Res Treat* 1988; 12: 3-5.
9. McGuire WL. Adjuvant therapy of node-negative breast cancer: another point of view. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 1075-6.
10. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, Fernö M, Kellander D, Olsson H. Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990; 322: 1045-53.
11. Barr L, Baum M. Time to abandon TNM staging of breast cancer. *Lancet* 1992; 339: 915-7.
12. Fisher B, Redmond C, Fisher E, Caplan R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer: Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Onc* 1988; 6: 1076-87.
13. Silvestrini R, Daidone MG, Valagussa P, Di Fronzo G, Mezzanotte G, Mariani L, et al. 3H-thymidine-labeling index as a prognostic indicator in node-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1321-6.
14. Fallenius AG, Auer GU, Carstensen JM. Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer* 1988; 62: 331-41.
15. Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *N Engl J Med* 1989; 320: 627-33.
16. Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD. Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47: 4729-35.
17. Kallioniemi OP, Blanco G, Alavaikko M, Hietanen T, Mattila J, Lanslahti K, et al. Improving the prognostic value of DNA flow cytometry in breast cancer by combining DNA index and S-phase fraction. A proposed classification of DNA histograms in breast cancer. *Cancer* 1988; 62: 2183-90.
18. O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, Millis RR, Allen D, Rubens RD, et al. DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1990; 61: 671-4.
19. Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P. The prognostic significance of nuclear DNA content in invasive breast cancer—a study with long-term follow-up. *Br J Cancer* 1989; 60: 693-700.
20. Kute TE, Muss HB, Cooper MR, Case LD, Buss P, Stanley V, et al. The use of flow cytometry for prognosis of stage II adjuvant breast cancer patients. *Cancer* 1990; 66: 1810-6.
21. UICC: International Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumors. Geneva: UICC, 1982.
22. Thorpe S, Poulsen HS, Pedersen KO, Rose C. Quality control of receptor analysis of breast cancer tissue in Denmark. *Acta Oncol* 1988; 27(Suppl.): 621-5.
23. Thornthwaite JT, Sugerbaker EV, Temple WJ. Preparation of tissues for DNA flow cytometric analysis. *Cytometry* 1980; 1: 229-37.
24. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW. Application of DNA flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and its clinical significance. *Cytometry* 1985; 6: 327-33.
25. Hiddeman W, Schumann J, Andreeff M, Barlogie B, Herman CJ, Leif RC, et al. Convention of nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry* 1984; 5: 445-6.
26. Baisch H, Gohde W, Linden WA. Analysis of PCP-data to determine the fraction of cells in various phases of cell cycle. *Rad Environm Biophys* 1975; 12: 31-9.
27. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Statist Assoc* 1958; 53: 457-81.
28. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966; 50: 163-70.
29. Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *J Roy Stat Soc B* 1972; 34: 187-220.
30. Sigurdsson H. Indicators of prognosis in breast cancer with emphasis on flow cytometric DNA analysis of ploidy and S-phase fraction. Lund: G. Ben. prentstofa hf., 1992.
31. McGuire WL. Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1990; 83: 154-5.
32. Höst H, Lund E. Age as a prognostic factor in breast cancer. *Cancer* 1986; 57: 2217-21.
33. Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, Dalberg M, Fernö M, Kellander D, et al. Flow cytometry in primary breast cancer: improving the prognostic value of the fraction of cells in the S-phase by optimal categorization of cut-off levels. *Br J Cancer* 1990; 62: 786-90.
34. Kallioniemi O-P, Kärkkäinen A, Auvinen O, Mattila J, Koivula T, Hakama M. DNA flow cytometry analysis indicates that many breast cancers detected in the first round of mammography screening have a low malignant potential. *Int J Cancer* 1988; 42: 697-702.