

Κλινική και προγνωστική σημασία της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών των γονιδίων επιδιόρθωσης, σε σποραδικά ορδοκολικά καρκινώματα. Συσχέτιση με την πρωτεΐνη του p53, τη μικροαγγειακή πυκνότητα και την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα

Μεδίτσκου Σ., Νενοπούλου Ε., Κωτούλα Β., Παπαδημητρίου Κ.

Clinical significance of MMR gene aberrant expression in sporadic colorectal carcinomas. Immunohistochemical investigation

Meditzskou S., Nenopoulou E., Kotoula V., Papadimitriou K.

Dept of Pathology, Medical School, Aristotelian University of Thessaloniki

Introduction-Aim: The mismatch repair (MMR) deficiency pathway to malignancy, i.e., aberrant MMR genes expression giving rise to microsatellite instability (MSI), is considered to be implicated in the pathogenesis of a subset (10-20%) of sporadic colorectal carcinomas and in the majority (85-90%) of tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC).

In this study we examined the clinical significance of MMR gene aberrant expression in sporadic colorectal cancer by immunohistochemistry for MSH2 and MLH1 in correlation with p53 expression, intratumoral microvessel density (MVD), proliferation activity and clinicopathological features, with multivariate analysis.

Materials and Methods: Ninety-five sporadic colorectal carcinomas were evaluated morphologically and immunohistochemically using anti-p53, Ki67, CD34, MSH2-1, MSH2-2 and MLH1. The minimum follow up was 5 years. The evaluation of immunohistochemical expression was performed by using an interactive morphometric program of image analysis, Prodit 5,2. Statistical analysis was carried out using the statistic software SPSS.

Results: Lack of expression of both MSH2 and MLH1, or of either one, was observed in 22% of cases and is observed in right sided, mucinous, partly mucinous or low differentiated carcinomas. Loss of mismatch repair gene expression was also found to correlate with low microvessel density and absence or partial absence of P53 expression. Dukes classification and the expression of MLH1, in this study,

were independent prognostic factors. P53 overexpression correlated with worse prognosis.

Conclusions: Our results favor the view that tumors, due to repair deficiency constitute a special group with different prognosis and distinct clinicopathological and molecular features. Immunohistochemic examination of mismatch repair genes can quickly, inexpensively, immediately, distinguish group of carcinomas arising from MMR deficiency pathway.

Key words: MMR gene proteins, MLH1, MSH2, sporadic colorectal cancers.

Εισαγωγή-Σκοπός: Ο μηχανισμός καρκινογένεσης μέσω ανεπάρκειας του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA (Mismatch repair-MMR) οδηγεί σε μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και είναι υπεύθυνος για την παθογένεια ομάδος (10-20%) σποραδικών ορθοκολικών καρκινωμάτων (Ο.Κ.) και της πλειονότητας (85-90%) των όγκων των ασθενών με σύνδρομο του κληρονομικού μη πολυποδιασικού ορθοκολικού καρκίνου (HNPCC).

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την προγνωστική σημασία της διαταραχής της έκφρασης των πρωτεϊνών των MSH2 και MLH1 γονιδίων επιδιόρθωσης, σε σποραδικά Ο.Κ., σε συσχετισμό με την έκφραση του p53, την ενδοογκική μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD), την πολλαπλασιαστική δραστηριότητα και τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, με πολυπαραγοντική ανάλυση.

Υλικό-Μέθοδοι: Ενενήντα πέντε σποραδικά Ο.Κ. εκτιμήθηκαν μορφολογικά και ανοσοϊστοχημικά, χρησιμοποιώντας τα αντισώματα αντι- pP53, CD34, Ki 67, MSH2-1, MSH2-2 και MLH1. Ο ελάχιστος χρόνος follow-up ήταν τα 5 και ο μέγιστος τα 10 χρόνια. Η εκτίμηση των ανοσοχρώσεων έγινε με την βοήθεια αλληλεπιδραστικού συστήματος ανάλυσης εικόνας, Prodit 5,2. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού SPSS.

Αποτελέσματα: Απώλεια της έκφρασης των MSH2 και MLH1 παρατηρήθηκε στο 22% των περιπτώσεων και εμφανίστηκε συχνότερα στα δεξιά εντοπιζόμενα καρκινώματα, τα βλεννώδη, τα εν μέρει βλεννώδη, ή τα χαμηλής διαφοροποίησης και σε εκείνα με χαμηλή MVD, μηδενική ή χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης p53 και καλλίτερη επιβίωση. Η σταδιοποίηση κατά Dukes και η έκφραση του MLH1 αναδείχθηκαν ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες. Η αυξημένη έκφραση του P53 σχετίστηκε με χειρότερη πρόγνωση.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματά μας ενισχύουν την άποψη ότι οι όγκοι που οφείλονται σε ανεπάρκεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης αποτελούν ιδιαίτερη ομάδα με διαφορετική πρόγνωση και διαφορετικά κλινικοπαθολογοανατομικά και μοριακά χαρακτηριστικά. Η ανοσοϊστοχημική μελέτη των (MMR) γονιδίων μπορεί εύκολα, γρήγορα και φθηνά να ξεχωρίσει ομάδα καρκινωμάτων που οφείλονται σε ανεπάρκεια του MMR μηχανισμού.

Λέξεις κλειδιά: MMR γονίδια, MLH1, MSH2, σποραδικά ορθοκολικά καρκινώματα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου είναι από τους συχνότερους κακοήθεις όγκους και τις συχνότερες αιτίες θανάτου για τον άνθρωπο.¹⁻³ Επιπλέον είναι από τους θεραπεύσιμους

όγκους του γαστρεντερικού σωλήνα.⁴ Η μεγάλη ετερογένεια ως προς τη βιολογική συμπεριφορά τους, οδήγησε στην αναζήτηση κλινικών και μορφολογικών παραμέτρων, οι οποίες θα προσδιορίζουν με μεγαλύτερη ακρίβεια την

ενδεχομένως επιδεικτική συμπεριφορά των νεοπλασμάτων αυτών.

Οι κλασικοί, μορφολογικοί προγνωστικοί δείκτες για τα καρκινώματα, όπως ο ιστολογικός τύπος, ο βαθμός κακοήθειας και το στάδιο της νόσου προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες και είναι αναντικατάστατοι. Πολλές φορές, όμως, δεν επαρκούν. Διαρκώς προσδιορίζονται νέοι μοριακοί-βιολογικοί δείκτες (ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια, γονίδια επιδιόρθωσης και διατήρησης του DNA, δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ορμονικοί υποδοχείς, δείκτες που σχετίζονται με τη διήθηση, τη νεοαγγείωση και τους μηχανισμούς μετάστασης).

Οι παραπάνω δείκτες υπεισέρχονται με ποικίλους τρόπους στη νεοπλασματική διαδικασία. Σήμερα είναι παραδεκτοί δύο (τουλάχιστον) παθογενετικοί μηχανισμοί καρκινογένεσης:

1. Μηχανισμός με απώλεια ετεροζυγωτίας (Loss of Eterozygosity Pathway) μια γραμμική, πολυσταδιακή διαδικασία με ενεργοποίηση γονιδίων και απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων, οδηγεί σε χρωμοσωμική αστάθεια και αφορά την πλειονότητα των Ο.Κ. και τα Α.Ρ.Κ.^{5,6}
2. Μηχανισμός μέσω ανεπάρκειας του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA (Mismatch Repair deficiency Pathway). Το MMR σύστημα αποτελείται από τουλάχιστον 6 γονίδια (MMR- Mismatch repair genes): hMLH1, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1, hPMS2. Τα MMR γονίδια κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για την διόρθωση των DNA mismatches- "μικρολαδών" που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA και περιέχουν μικρές, απλές, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες-μικροδορυφόρους (microsatellites). Ανεπάρκεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης οδηγεί σε μικροδορυφορική αστάθεια (MSI) και αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων που αφορούν απάλειψη ή προσθήκη σε μικροδορυφόρους. Ο μηχανισμός αυτός αφορά το 10-20% των σποραδικών Ο.Κ. και την πλειονότητα των όγκων των ασθενών με σύνδρομο του κληρονομικού μη πολυποδιαστικού ορθοκολικού καρκίνου-H.N.P.C.C.⁷⁻¹³

Τα νεοπλάσματα αυτά, με υψηλή συχνότητα μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-H) αποτελούν ιδιαίτερη ομάδα με διαφορετική πρόγνωση, διαφορετική απάντηση στη χημειοθε-

ραπεία¹⁴⁻¹⁶ και με ιδιαίτερα κλινικοπαθολογοανατομικά και μοριακά χαρακτηριστικά. Εμφανίζουν διπλοϊδία, απουσία ή χαμηλή συχνότητα απώλειας ετεροζυγωτίας, ενιαίο προφίλ γονιδίων που υφίστανται σωματικές μεταλλάξεις κατά τη διάρκεια της νεοπλασματικής διαδικασίας. Εμφανίζονται σε νεαρές ηλικίες, εντοπίζονται συχνότερα στο δεξιό (R) κόλον, είναι συχνά πολυποδοειδή κι έχουν απώδητικά όρια, είναι συχνά βλεννώδη ή έχουν χαμηλή διαφοροποίηση ή κύτταρα "δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου" και συχνά πυκνή λεμφοκυτταρική διήθηση (Crohn's like). Οι ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πολλαπλών σύγχρονων ή μετάχρονων καρκινωμάτων παχέος εντέρου και ως εκ τούτου πρέπει να ελέγχονται τακτικά με κολονοσκοπήσεις. Επιπλέον οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης άλλων τύπων καρκινωμάτων, σύγχρονα ή μετάχρονα, όπως καρκινώματα ενδομητρίου, ωοθήκης, στομάχου, λεπτού εντέρου, ουροδόχου κύστης και άλλων.^{13,17-22} Επιπλέον τα άτομα πρώτου ή δεύτερου βαθμού συγγενείας των ασθενών με H.M.R.D.S (Hereditary Mismatch Deficiency Syndrome) πρέπει να θεωρούνται ως ομάδα αυξημένου κινδύνου για εμφάνιση καρκινώματος σε νεότερη ηλικία και επομένως θα είναι χρήσιμο να ελέγχονται για μικροδορυφορική αστάθεια.¹³

Η προσέγγιση των μικροδορυφορικά ασταδών καρκινωμάτων είναι σημαντική τόσο για τους ίδιους τους ασθενείς όσο και για τους συγγενείς τους. Η απ' ευθείας μελέτη της MSI απαιτεί οργανωμένο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, ειδικές γνώσεις και αυξημένο κόστος. Αντίθετα, όπως έχει πρόσφατα δείξει, η ανοσοϊστοχημική απώλεια έκφρασης των MLH1 και MSH2 πρωτεϊνών παρατηρείται στο 75% των περιπτώσεων με MSI και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μια γρήγορη, φθηνή και αποτελεσματική μέθοδος ανάδειξης των MSI-H καρκινωμάτων.²³⁻²⁶

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών των γονιδίων επιδιόρθωσης MSH₂ και MLH₁, της πρωτεΐνης του p53 ογκοκατασταλτικού γονιδίου, του Ki₆₇ που είναι δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του CD₃₄ για την εκτίμηση της μικροαγγειακής πυκνότητας (MVD).

Σκοπός της μελέτης ήταν αφ' ενός να αναζητηθούν συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών αλλά και με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους με πολυπαραγοντική ανάλυση και αφ'

ετέρου να προσεγγίσουμε ανοσοϊστοχημικά την ομάδα των Ο.Κ. καρκινωμάτων με υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια ανάμεσα σε σποραδικά καρκινώματα.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην μελέτη περιλαμβάνονται 96 διαδοχικοί ασθενείς με καρκίνωμα παχέος εντέρου. Το υλικό των περιπτώσεων προέρχεται από τα αρχεία του παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Α.Π.Θ. κατά τα έτη 1985-1990. Για κάθε ασθενή ελήφθησαν υπ' όψη οι εξής κλινικές παράμετροι: φύλο, ηλικία, εντόπιση, επιβίωση. Ο χρόνος επιβίωσης υπολογίστηκε από τη στιγμή της αρχικής ιστοπαθολογικής διάγνωσης μέχρι το θάνατο εξαιτίας της νόσου ή μέχρι τα 10 χρόνια που ήταν η συνολική διάρκεια του follow-up. Όλοι οι ασθενείς της μελέτης δεν είχαν εμφανείς ενδείξεις κληρονομικής νόσου.

Όλοι οι όγκοι ήταν αδενοκαρκινώματα (Α) καλής, μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης.

Όταν υπήρχε παραγωγή εξωκυττάριας βλέννας περισσότερο από το 50% του νεοπλασματικού ιστού, τα αδενοκαρκινώματα χαρακτηρίστηκαν ως βλενώδη (βλ). Ξεχωρίσαμε επίσης τις περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων με παραγωγή βλέννας λιγότερο από το 50% και περισσότερο από το 20% της νεοπλασματικής μάζας ως αδενοκαρκινώματα με μερική παραγωγή βλέννας (Α+βλ).

Η σταδιοποίηση των νεοπλασμάτων έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια κατά Dukes και κατά

T.N.M. της διεθνούς ταξινόμησης (U.I.C.C.).^{27,28} Στάδιο Α ή Ι, στάδιο Β ή ΙΙ, στάδιο C ή ΙΙΙ, στάδιο D ή ΙV. Στο στάδιο C συμπεριλήφθησαν και οι περιπτώσεις με μεταστατικά οζίδια στο λίπος διαμέτρου >3mm, τα οποία θεωρήθηκε ότι αντιστοιχούν σε λεμφαδένες πλήρως κατελημμένους από το νεόπλασμα κι εφόσον δεν ήταν κατά συνέχεια ιστού με τον κυρίως όγκο.²⁹

Η φλεγμονή στο υπόστρωμα του όγκου εκτιμήθηκε ανάλογα με την πυκνότητα των φλεγμονωδών κυτταρικών στοιχείων σε ήπια (+), μέτρια (++) και πυκνή (+++).

Για την ανοσοϊστοχημική διερεύνηση ελήφθησαν τομές παραφίνης πάχους 4μ που τοποθετήθηκαν σε πλακίδια επεξεργασμένα με κόλλα "vectabond" και εφαρμόσθηκε η ανοσοϊστοχημική μέθοδος στρεπταβιδίνης βιοτίνης.

Χρησιμοποιήθηκαν 6 (έξι) αντισώματα (Πίνακας 1) με διαφορετικές αραιώσεις και διαφορετικούς χρόνους επώασης καθώς και διαφορετική προεργασία σε "υψηλή θερμοκρασία" (microwave). Γενικά, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των τομών, τοποθέτηση των τομών σε διάλυμα κιτρικού pH 6.0 και επώαση των τομών σε υψηλή θερμοκρασία σε φούρνο μικροκυμάτων (Philips Whirlpool) για 10 ή 20 min (2x5' ή 4x5'). Δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση για 20-min σε 0.6% H₂O₂ σε μεθανόλη. Κατόπιν οι τομές επωάζοντο με ορό rabbit ή swine για δέσμευση των μη ειδικών

Πίνακας 1. Περιγραφή αντισωμάτων(Abs)

Αντιγόνα	Αντισώματα	Προεργασία "υψηλής θερμοκρασίας"	Αραιώσεις	Χρόνος Επώασης
N-terminus P ₅₃ πρωτεΐνης	anti-P ₅₃ Clone DO-7 (DAKO)	3 x 5 min	1:100	1h
Human Ki ₆₇ CD ₃₄	anti-Ki ₆₇ (DAKO) AntiCD ₃₄ Clone Qbend/10 (NOVO)	3 x 10 min	1:50	24h
N-terminus MSH ₂ Πρωτεΐνης	anti N-terminus MSH ₂ Clone GB12 (Oncogene)	4 x 4 min	1:50	24h
Carboxy-terminus MSH ₂ πρωτεΐνης	anti-carboxy-terminus MSH ₂ Clone FE11 (Oncogene)	4 x 4 min	1:50	24h
Full length MLH ₁ Πρωτεΐνη	anti MLH ₁ Clone 14 (Oncogene)	4 x 5 min	1:25	24h

Πίνακας 2. Έκφραση P₅₃, Ki₆₇, CD34 (Μέση, Διάμεση τιμή, εκατοστιαίες δέσεις)

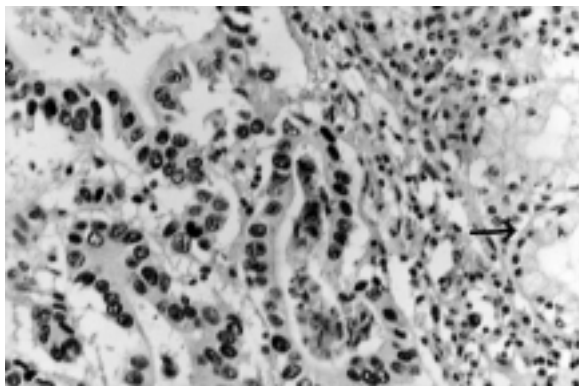
	Ki ₆₇	P ₅₃	CD34
Mean	36%	47%	113,5
Median	33%	41%	106
St. Dev	± 22,5%	± 34%	± 42
Minimum	0	0	30
Maximum	96%	97%	230
Percentiles			
25	19%	16%	82
50	33%	41%	106
75	48%	85%	138

αντιγονικών δέσεων.

Επώαση με τον ειδικό αντιορό σε διαφορετικούς χρόνους επώασης για το κάθε αντίσωμα. Η σύνδεση του αντισώματος επιτυγχάνεται με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα rabbit anti mouse ή swine anti rabbit. Κατόπιν οι τομές επώαζοντο με το σύμπλεγμα στρεπταβιδίνης- βιοτίνης με υπεροξειδάση (ABC). Ακολουθούσε ανίχνευση της αντίδρασης υπεροξειδάσης με διαμινοβενζιδίνη (DAB) ως χρωμογόνο και μετάχρωση με αιματοξυλίνη Harris.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα MSH2-1 και MSH2-2 αντισώματα, που χρησιμοποιήθηκαν, αναγνωρίζουν το αμινικό και το καρβοξυλικό άκρο αντίστοιχα της πρωτεΐνης του MSH2 γονιδίου. Απώλεια έκφρασης, επομένως, ενός εκάστου θα αντικατοπτρίζει αλλαγές στο γονιδίωμα σε δέσεις που είναι υπεύθυνες για τα δύο άκρα της MSH2 πρωτεΐνης.

Η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των MSH₂₋₁, MSH₂₋₂ και MLH₁ έγινε χωρίς τη γνώση των κλινικοπαθολογοανατομι-



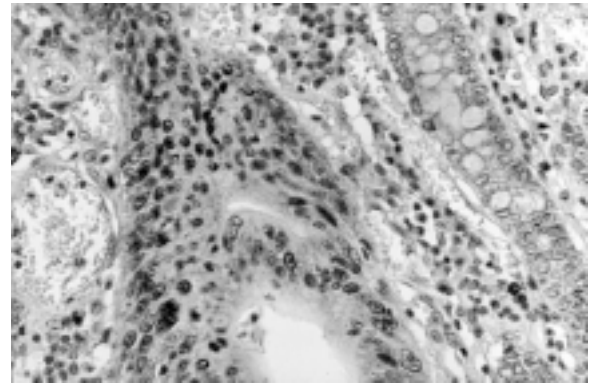
Εικόνα 1. Έντονη έκφραση της p53 πρωτεΐνης. (x100) (Αρνητικότητα στα φυσιολογικά αδένια-βέλος)

κών στοιχείων του όγκου. Η χρώση ανιχνεύθηκε κυρίως στον πυρήνα φυσιολογικών ή νεοπλασματικών κυττάρων.

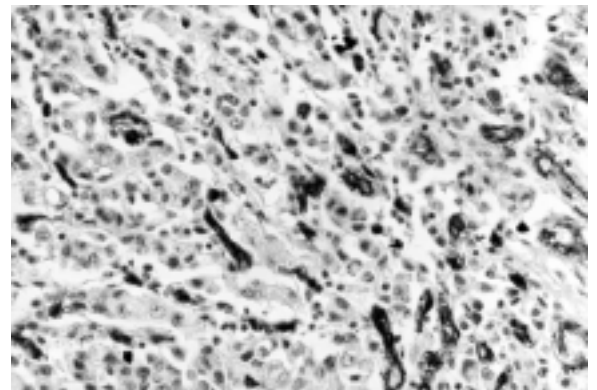
Σε όλες τις περιπτώσεις ανιχνεύθηκε πυρηνική θετικότητα στα επιθηλιακά κύτταρα κυρίως της βάσης των κρυπτών και των εν τω βάθει αδένων του φυσιολογικού επιθηλίου σε παρακείμενες δέσεις του νεοπλάσματος αλλά και στα βλαστικά κέντρα των λεμφοξιδίων όπου αυτά υπήρχαν, σε στρωματικά κύτταρα του χορίου και στα μυϊκά κύτταρα. Η ως άνω θετικότητα των φυσιολογικών κυττάρων αποτελούσε και τον εσωτερικό θετικό μάρτυρα της χρώσης. Η αξιολόγηση της χρώσης για τα καρκινώματα έγινε ως εξής:

Θετικά(+): Τα καρκινώματα τα οποία εμφάνιζαν πυρηνική θετικότητα στην πλειονότητα των νεοπλασματικών κυττάρων (Εικόνα 4).

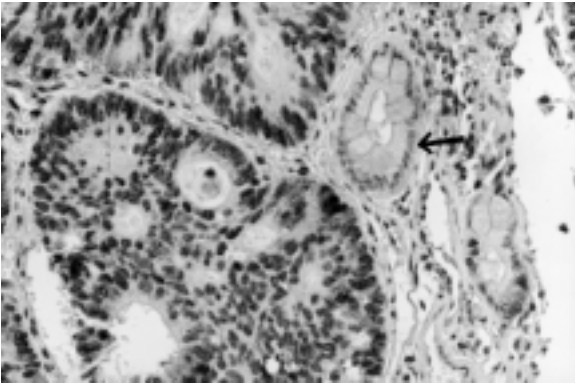
Αρνητικά (-): Τα καρκινώματα στα οποία δεν ανιχνεύεται πυρηνική θετικότητα (απώλεια



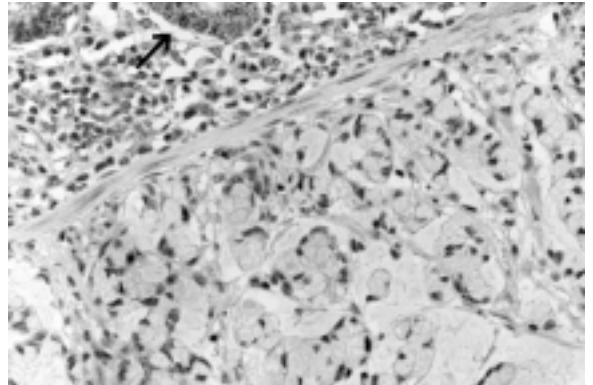
Εικόνα 2. Ki67-Έντονη πολλαπλασιαστική δραστηριότητα (x100)



Εικόνα 3. CD34- αυξημένη MVD (x100)



Εικόνα 4. Ανοσοϊστοχημική θετικότητα στο MLH1. (Θετικότητα και στα φυσιολογικά αδένια-βέλος)



Εικόνα 5. Απώλεια της έκφρασης του MLH1 (x100). (θετικότητα στα φυσιολογικά αδένια-βέλος)

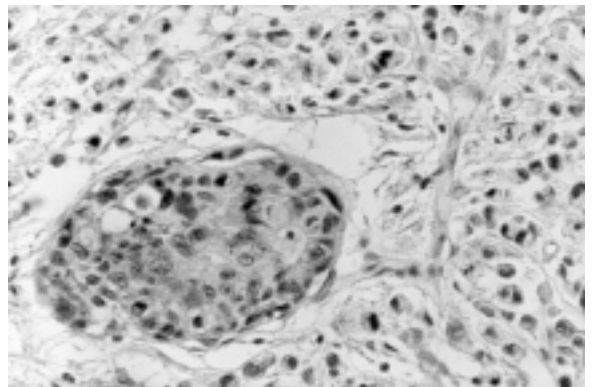
έκφρασης) (Εικόνα 5) Επειδή σε αρκετούς όγκους παρατηρήθηκε ετερογένεια κατανομής στην ένταση και στην έκταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, θεωρήσαμε ως:

Μερικώς θετικά (±) (Εικόνα 6) τα καρκινώματα στα οποία υπήρχε: 1) Διάσπαρτη θετικότητα 2) Περιοχική θετικότητα, η οποία πολλές φορές αφορούσε α) θετικότητα σε επιφανειακές δέσεις του όγκου και αρνητικότητα στο εν τω βάθει διηθητικό τμήμα του όγκου. β) αρνητικότητα στο βλεννώδες τμήμα του όγκου και θετικότητα στο τμήμα με καλλίτερη διαφοροποίηση. γ) αρνητικότητα στα "κύτταρα "δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου" και θετικότητα στο τμήμα με καλλίτερη διαφοροποίηση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των γονιδίων επιδιόρθωσης (MMR) τα καρκινώματα ομαδοποιήθηκαν περαιτέρω σε 3 ή 2 ομάδες ως εξής:

1. MMR θετικά (MMR+) όταν υπήρχε θετική έκφραση και των τριών αντισωμάτων.
2. MMRαρνητικά (MMR-) όταν υπήρχε έλλειψη έκφρασης σε ένα τουλάχιστον αντίσωμα.
3. MMR± όταν υπήρχε μερική θετικότητα (±) σε ένα τουλάχιστον αντίσωμα.

Η εκτίμηση του ποσοστού των θετικών κυττάρων στους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες P₅₃, Ki₆₇, CD₃₄ πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του αλληλεπιδραστικού (interactive) μορφομετρικού προγράμματος ανάλυσης εικόνας (image analysis) Prodit 5,2.

Ειδικότερα, για το P₅₃ και το Ki₆₇ επιλέχθηκε η δυνατότητα διαχωρισμού δύο τύπων κυττάρων (πυρήνων), θετικών (+) κι αρνητικών (-), με διαδοχική εφαρμογή πλεγμάτων Weibel του



Εικόνα 6. Μερική απώλεια της έκφρασης του MLH1(x100)

συστήματος έως ότου γίνει η καταμέτρηση 500 συνολικά (+ και -) νεοπλασματικών κυττάρων. Η εκτίμηση του αριθμού των νεοαγγείων με την ανοσοχρώση για CD₃₄ έγινε ως εξής: σάρωση της τομής σε μικρή μεγέθυνση για τον εντοπισμό της δέσης του όγκου με την μεγαλύτερη πυκνότητα αγγείων (hot spots), εξαιρώντας τις επιφανειακές δέσεις, τις περιοχές των εξελκώσεων και των νεκρώσεων. Η περαιτέρω εκτίμηση γινόταν με τη βοήθεια του αλληλεπιδραστικού προγράμματος εικόνας για νεοαγγείωση (Prodit 5.2 –neovascularization). Καταμετρούνταν όλα τα αγγεία εφόσον είχαν μέγεθος τέτοιο ώστε ο αυλός να χωρά έως 8 (οκτώ) ερυθρά αιμοσφαίρια. Καταμετρούνταν επίσης ομάδες ενδοθηλιακών κυττάρων χωρίς αυλό που ξεχώριζαν σαφώς από τα παρακείμενα αγγεία. Δεν μετρούνταν οι διακλαδώσεις των αγγείων. Τελικά εδίδετο από το σύστημα

η πυκνότητα των αγγείων ανά mm².

Η στατιστική μεθοδολογία έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού SPSS. Για τη συσχέτιση δύο ποιοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν ο χ^2 και ο Fischer έλεγχος. Για τη συσχέτιση ποιοτικής/ποσοτικής μεταβλητής χρησιμοποιήθηκαν ο student's t και ο ANOVA έλεγχος. Για τη συσχέτιση πολλών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε η Cox Regression μέθοδος. Οι καμπύλες έγιναν με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Για όλους τους ελέγχους το ανώτερο επίπεδο σημαντικότητας ήταν το 0,05.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι 59 των ασθενών ήταν άνδρες και 37 γυναίκες. Το 83% των Ο.Κ. εμφανίζονταν σε ηλικία μεγαλύτερη των 50 ετών και μόλις το 17% σε νεότερες ηλικίες. Το 72% εντοπιζόταν στο αριστερό κόλον (L), ενώ το 28% εντοπιζόταν στο δεξιό (R) κόλον (τυφλό ανιόν και δεξιό ήμισυ εγκάρσιου κόλου).

Το 83% των Ο.Κ. εμφανίζονταν σε ηλικία μεγαλύτερη των 50 ετών και μόλις το 17% σε νεαρότερες ηλικίες. Τα περισσότερα (72%) εντοπίζονται αριστερά (L), ενώ το 28% δεξιά (R). Το 30% των ασθενών ζούσαν περισσότερο από 10 χρόνια και το 15% των περιπτώσεων ήταν σταδίου A κατά Dukes. Το 86,3% ήταν αδενοκαρκινώματα χωρίς ειδικούς χαρακτήρες (A), το 8,4% ήταν βλεννώδη(βλ) και το 5,3% ήταν εν μέρει βλεννώδη (A+βλ).

Το 48,4% των Ο.Κ. εμφάνιζε λεμφαδενικές μεταστάσεις (Dukes C) και μόλις το 14,7% περιοριζότο στο τοίχωμα του παχέος εντέρου. Τα καλής και μέτριας διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα εμφανίζονταν συχνότερα (91,7% και 87,1%) στις μεγαλύτερες ηλικίες (>50 ετών) ενώ σε μικρότερες ηλικίες συχνότερα ήταν τα αδενοκαρκινώματα χαμηλής ή εν μέρει βλεννώδους διαφοροποίησης (p <0.05).

Τα δεξιά εντοπιζόμενα ήταν συχνότερα βλεννώδη ή χαμηλής διαφοροποίησης (75%, 57%) (p <0,01).

Απώλεια ανοσοϊστοχημικής έκφρασης παρατηρήθηκε στο 16,3% των περιπτώσεων για το MSH2-1, στο 12% για το MSH2-2 και στο 5,5% για το MLH1 (Πίνακας 3). Το 22% των Ο.Κ. της μελέτης εμφάνισε απώλεια έκφρασης για ένα τουλάχιστον προϊόν γονιδίου επιδιόρθωσης (Πίνακας 3). Τα περισσότερα δεξιά εντοπιζόμενα αδενοκαρκινώματα εμφάνισαν απώλεια έκφρασης των γονιδίων επιδιόρθωσης με

Πίνακας 3. Κατανομή (%) της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των αντισωμάτων

Αντισώματα	Περιπτώσεις (N)	Περιπτώσεις %
MSH ₂₋₁		
-	15	16,3
±	12	13
+	65	70,7
MSH ₂₋₂		
-	11	12
±	7	7,6
+	74	80,4
MLH ₁		
-	5	5,5
±	10	11
+	91	83
MMR (3 groups)		
-	20	22
±	13	14,3
+	58	63,7
Ki ₆₇		
0-10%	10	10,5
10-33%	38	40
>33%	47	49
P ₅₃		
0-20%	29	30,9
20-40%	18	19,1
>40%	47	50
CD34		
<106αγγεία/mm ²	47	50,5
>106αγγεία/mm ²	46	49,5

εξαιρετικά σημαντικές τιμές του p: p <0,0001 για το MSH2-1, p <0,05 για το MSH2-2, και p <0,001 για το MLH1. Γενικά, το 72% των καρκινωμάτων που εντοπιζονταν δεξιά (R) εμφάνισαν πλήρη ή μερική απώλεια έκφρασης ενός τουλάχιστον προϊόντος γονιδίου επιδιόρθωσης (MMR- ή MMR±), δηλαδή είχαν πιθανώς υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια, με πολύ υψηλή στατιστικά σημαντική συσχέτιση p <0,0001 (Πίνακας 4). Αντιθέτως το 83% των αριστερά εντοπιζόμενων περιπτώσεων δεν εμφάνισαν διαταραχή της έκφρασης στο MSH2-1, το 86% στο MSH2-2 και το 92% στο MLH1.

Το 75% των βλεννώδων ή το 80% των μερικώς βλεννώδων αδενοκαρκινωμάτων εμφάνιζαν πλήρη ή μερική απώλεια ανοσοϊστοχημικής έκφρασης ενός τουλάχιστον γονιδίου επιδιόρθωσης (MMR-ή MMR+) (p <0,05) (Πίνακας 4).

Το ποσοστό των δετικών πυρήνων για το P53 ήταν μηδενικό ή ελάχιστο, στην ομάδα των καρκινωμάτων με απώλεια έκφρασης του

Πίνακας 4. MMR (3 ομάδες)/vs/Κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι

	Περιπτώσεις Total	MMR-	MMR±	MMR+	P
Ηλικία					
<50	18	22,2	27,8	50	NS
>50	73	21,9	11,6	67,1	
Εντόπιση					
Αριστερά	65	10,8	10,8	78,5	<0,0001
Δεξιά	25	52	20	28	
Διαφοροποίηση					
Καλή	12	16,7	33,3	50	<0,05
Μέτρια	58	15,5	6,9	77,6	
Χαμηλή	8	25	25	50	
Βλέννη>50%	5	60	20	20	
Βλέννη<50%	8	50	25	25	
Λεμφοκυτταρική Διήθηση					
Ήπια	45	28,1	17,8	64,4	NS
Μέτρια	32	21,4	12,5	59,4	
Πυκνή	14	17,8	7,1	71,4	
Dukes					
A	14	21,4	7,1	71,4	NS
B	32	25	9,4	65,6	
C	43	20,9	20,9	58,1	
D	2			100	

MSH2-1 (p <0,001) και του MLH1 (p <0,05) και των MMR- καρκινωμάτων (p <0,0001), αυξανόταν στις ομάδες με μερική απώλεια έκφρασης (±) και ήταν ιδιαίτερα υψηλό στα καρκινώματα τα οποία δεν εμφάνισαν διαταραχή της έκφρασης προϊόντος γονιδίου επιδιόρθωσης (Πίνακας 5).

Τα καρκινώματα παχέος εντέρου με απώλεια ανοσοϊστοχημικής έκφρασης ενός εκάστου ή ενός τουλάχιστον γονιδίου επιδιόρθωσης είχαν χαμηλή μικροαγγειακή πυκνότητα (MVD), σε σχέση με εκείνα τα οποία δεν εμφάνισαν διαταραχή στην έκφραση κάποιου γονιδίου, p <0,05 (Πίνακας 5). Μάλιστα στον έλεγχο κατά Duncan προέκυψαν δύο υποομά-

δες 1α) καρκινώματα με MSH2-1 (-) και CD34 <89,86 αγγεία/mm² 1β) καρκινώματα με MLH1(-) και CD34 <67 αγγεία/mm² αλλά και 2α) καρκινώματα με MSH2-1 (+) ή (±) και CD34 >112 αγγεία/mm² 2β) MLH1(+) ή (±) και CD34 >117αγγεία/mm².

Καρκινώματα παχέος εντέρου-επιβίωση

Το 85% των ασθενών με αδενοκαρκινώματα σταδίου A ή T.N.M. 1 εμφάνισαν 5ετή επιβίωση και περισσότερα από το 60% αυτών επιβίωσαν τουλάχιστον 10 χρόνια. Πενταετή επιβίωση εμφάνισε το 40% των αδενοκαρκινωμάτων σταδίου B και C κατά Dukes p <0.006 (Εικόνα 6). Τα O.K που είχαν υψηλή έκφραση

Πίνακας 5. Μέση τιμή έκφρασης ± τιμή απόκλισης των P₅₃, Ki₆₇, CD₃₄/vs/MMR (3 ομάδες)

Παράμετροι	MMR 3 ομάδες	Περιπτώσεις (N)	Mean ± SD	P
P ₅₃	-	20	0,245±0,270	<0,0001
	±	13	0,360±0,334	
	+	57	0,583±0,328	
Ki ₆₇	-	20	0,253±0,253	NS
	±	13	0,257±0,146	
	+	58	0,378±0,229	
CD ₃₄	-	19	93±42,38	0,05
	±	12	116,58±44,89	
	+	58	120,81±40,65	

P53 (>40% των νεοπλασματικών κυττάρων) είχαν χειρότερη επιβίωση, τόσο 5ετή όσο και 10ετή, από εκείνα που είχαν αρνητική ή σχεδόν αρνητική έκφραση του P53 ($p < 0,05$) (Εικόνα 7).

Η ομάδα των καρκινωμάτων με χαμηλή πολλαπλασιαστική δραστηριότητα (Ki67 <10%) είχε σε σημαντικό ποσοστό (70%) 5ετή επιβίωση σε σχέση με τα καρκινώματα με μέτρια (35%) ή υψηλή πολλαπλασιαστική δραστηριότητα (50%), χωρίς όμως στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην επιβίωση των ασθενών σε σχέση με τη χαμηλή ή υψηλή μικροαγγειακή πυκνό-

τητα.

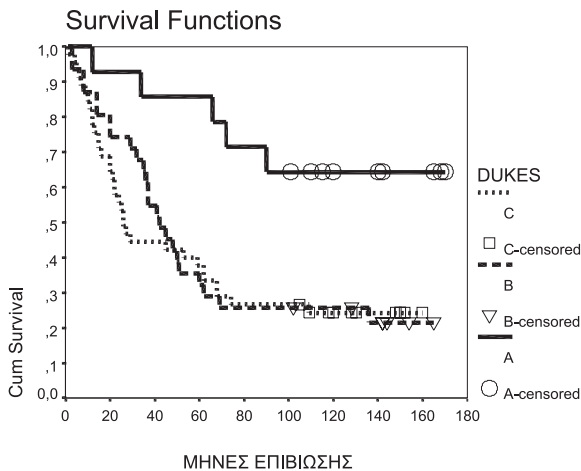
Σε ό,τι αφορά τα γονίδια επιδιόρθωσης, στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στην έκφραση του γονιδίου MLH1 και μάλιστα 5ετή επιβίωση είχε το 70% των αδενοκαρκινωμάτων με αρνητική ή μερικώς αρνητική έκφραση του MLH1, σε σχέση με το 40% αυτών με θετική έκφραση MLH1 ($p < 0,05$) (Εικόνα 8). Για τα υπόλοιπα γονίδια επιδιόρθωσης 5ετής επιβίωση παρατηρήθηκε στο 65-60% των MSH2-1 και MSH2-2 αρνητικών καρκινωμάτων σε σχέση με το 40-45% των MSH2-1 και MSH2-2 θετικών καρκινωμάτων χωρίς όμως στατιστικώς σημαντική τιμή P. Παρόμοια κατανομή παρατηρήθηκε και στις ομάδες MMR-και MMR+.

Από την πολυπαραγοντική ανάλυση (Cox Regression) προέκυψε ότι η σταδιοποίηση κατά Dukes και η ανοσοϊστοχημική έκφραση του MLH1 μπορούν να θεωρηθούν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες επιβίωσης. Από τις υπόλοιπες παραμέτρους στην πολυπαραγοντική ανάλυση, το P53 είχε οριακή προγνωστική συσχέτιση ($p = 0,09$) (Πίνακας 6).

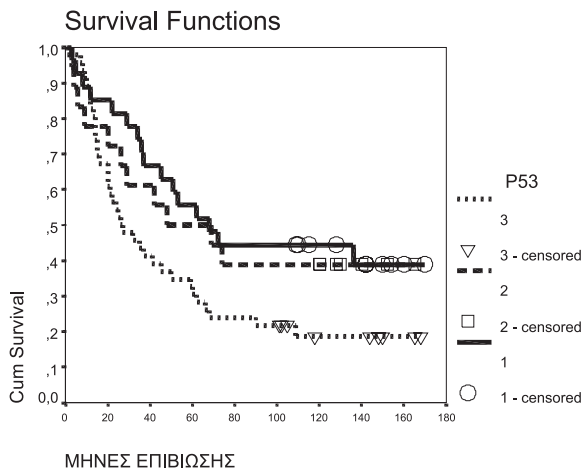
Συζήτηση

Είναι πλέον γνωστό ότι ένα ποσοστό, περίπου 15%, των σποραδικών Ο.Κ. σχετίζονται με ανεπάρκεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA και τα οποία χαρακτηρίζονται φαινοτυπικά από υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια MSI-H (high- microsatellite instability).

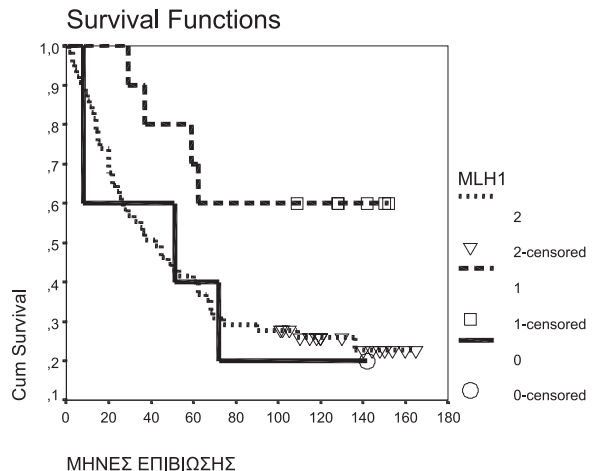
Για τον έλεγχο μεταλλάξεων των γονιδίων



Εικόνα 7. Καμπύλη Kaplan-Meier: Σταδιοποίηση κατά Dukes/O.K.



Εικόνα 8. Καμπύλη Kaplan-Meier: Έκφραση p53 πρωτεΐνης/O.K.



Εικόνα 9. Καμπύλη Kaplan-Meier: Έκφραση MLH1/O.K.

Πίνακας 6. Πολυπαραγοντική Ανάλυση

Παράμετροι	Univariate	Multivariate
	P	P
Ηλικία	NS	0,18
Εντόπιση	NS	0,46
Διαφοροποίηση	0,027	0,43
Dukes	0,054	0,0027*
P ₅₃	0,05	0,098
Ki ₆₇	NS	0,40
CD34	NS	0,88
MSH ₂₋₁	NS	0,44
MSH ₂₋₂	NS	0,57
MLH ₁	0,03	0,045*
MMR ₃	NS	0,87

επιδιόρθωσης και γενικότερα της MSI, απαιτείται οργανωμένο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, ειδικές γνώσεις και αυξημένο κόστος.^{30,31}

Αντίθετα, ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων επιδιόρθωσης είναι ένας πρακτικός και φτηνός τρόπος ανάδειξης MSI-H καρκινωμάτων.^{23-26,32}

Στα MSI-H σποραδικά καρκινώματα υπάρχει υπερμεθυλίωση της περιοχής του προαγωγέα του hMLH1 με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης του mRNA του hMLH1 και ανώμαλη παραγωγή πρωτεΐνης η οποία είναι ασταθής ή αποδομείται γρήγορα. Έτσι η ανοσοϊστοχημική απουσία έκφρασης των απενεργοποιημένων MMR γονιδίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ανεπάρκειας της γονιδιακής επιδιόρθωσης.³³⁻³⁷ Είναι προφανές ότι ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος μόνο αδρά μπορεί να προσδιορίσει ομάδα MSI-H καρκινωμάτων και πρέπει να ακολουθείται από μοριακή μελέτη.

Στην παρούσα μελέτη 22% των Ο.Κ. εμφάνισαν πλήρη απώλεια έκφρασης της πρωτεΐνης ενός τουλάχιστον γονιδίου επιδιόρθωσης από τα τρία που χρησιμοποιήθηκαν. Στην μελέτη μας υπάρχουν περιπτώσεις με μερική έκφραση των γονιδίων επιδιόρθωσης αλλά και περιπτώσεις χωρίς διαταραχή της έκφρασης των γονιδίων οι οποίες παρόλα αυτά πιθανόν αντιστοιχούν σε MSI-H καρκινώματα και τούτο διότι πιθανόν τα αντισώματα έναντι των προϊόντων γονιδίων που χρησιμοποιήσαμε να αναγνωρίζουν τη τροποποιημένη πρωτεΐνη ή μπορεί η μετάλλαξη να αφορά άλλα γονίδια του συμπλέγματος γονιδίων επιδιόρθωσης όπως hPMS₁, hPMS₂ ή μπορεί να συνυπάρχουν διαφορετικοί νεοπλασματικοί κλώνοι στον ίδιο όγκο.^{32,37,38}

Είναι γνωστό ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των MSI-H καρκινωμάτων έχουν ασυνδετικές ή από μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης μεταλλάξεις (nonsense ή frameshift) κυρίως του hMSH₂ ή του hMLH₁ γονιδίου (Leach FS 1996). Σπάνια, έχουν περιγραφεί δυσυνδετικές (missense) μεταλλάξεις των γονιδίων επιδιόρθωσης σε ασθενείς με HMRDS και δεν είναι γνωστό εάν έχουν σαν αποτέλεσμα απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης.^{38,39} Στις περιπτώσεις με μερική έκφραση των προϊόντων των γονιδίων MSH₂₋₁, MSH₂₋₂ και hMLH₁ παρατηρήσαμε ότι η δετικότητα συχνά εντοπιζέτο στην επιφάνεια του όγκου, ή, σε θέσεις με διαφορετική διαφοροποίηση από τον υπόλοιπο όγκο. Επίσης σε μερικές περιπτώσεις παρατηρήθηκε απώλεια έκφρασης στον όγκο, ενώ η πρωτεΐνη εκφραζόταν στις λεμφαδενικές μεταστάσεις. Φαίνεται ότι πρόκειται για παραγωγή πρωτεΐνης από το μη νεοπλασματικό ιστό προς τον όγκο ή ότι πρόκειται για παρουσία περισσοτέρων του ενός, νεοπλασματικών κλώνων, με διαφορετικό φαινότυπο.^{35,32}

Στη μελέτη μας βρήκαμε ότι τα ΟΚ με απώλεια έκφρασης των MSH₂₋₁, MLH₁ αλλά και η ομάδα των MMR(-) ΟΚ εντοπιζόταν συχνότερα δεξιά (R) με εξαιρετικά ισχυρή συσχέτιση (p <0,0001), ήταν συχνότερα χαμηλής διαφοροποίησης βλεννώδους ή εν μέρει βλεννώδους διαφοροποίησης (p <0,005). Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και οι Marcus V και συν. (1999)²⁴, Kane MP και συν (1997)³⁶, Kim H και συν (1998)³², Cawkwell και συν (1999)²³, Chaves και συν (2000)²⁵, Wart και συν (2001).²⁶

Υψηλή συχνότητα πυρηνικής ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του P₅₃ ή μεταλλάξεων P₅₃ παρατηρείται στα αριστερά εντοπιζόμενα (L) καρκινώματα και χαμηλή ή μηδενική στα δεξιά (R).^{40,41} Τα τελευταία εμφανίζουν και υψηλή συχνότητα μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-H).^{7,11,13,42}

Παρόμοια αποτελέσματα μηδενικής ή χαμηλής έκφρασης P₅₃ βρήκαμε στην παρούσα μελέτη για τα MMR(-) ορδοκολικά καρκινώματα και μάλιστα για τα τελευταία με εξαιρετικά σημαντική συσχέτιση (p <0,0001). Φαίνεται λοιπόν ότι τα MSI-H νεοπλάσματα ακολουθούν διαφορετικό παθογενετικό μηχανισμό από εκείνον που χαρακτηρίζεται από μεταλλάξεις του P₅₃ και άλλων ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Τα περισσότερα –σχεδόν όλα– χαρακτηρίζονται από απουσία μεταλλάξεων του ογκο-

κατασταλτικού γονιδίου P₅₃.^{43,44,13}

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των πολυάριθμων μελετών και της παρούσης μελέτης, που αφορούν την αγγειογένεση, μπορεί να οφείλονται στις διαφορετικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται τόσο ως προς τη χρώση για την ανάδειξη των αγγείων όσο και ως προς τον τρόπο μέτρησης των μικροαγγείων στον όγκο.

Οι ενδοθηλιακοί δείκτες που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι ο FVIII, το CD31 και το CD34 τα οποία έχουν διαφορετική ευαισθησία και διαφορετικά χαρακτηριστικά στην ανοσοχρώση. Αναδεικνύουν τόσο τα προυπάρχοντα αγγεία όσο και τα νεοαγγεία.

Εμείς χρησιμοποιήσαμε το CD34. Δεν υπάρχουν μελέτες που να συγκρίνουν τα 3 αυτά αντισώματα σε μεγάλες σειρές νεοπλασμάτων. Στη μελέτη του Martin L και συν (1997)⁴⁵ φαίνεται ότι το CD34 είναι πιο ευαίσθητο και έχει τις υψηλότερες συσχετίσεις με την επιβίωση σε σχέση με τα FVIII και CD31.

Οι μέθοδοι μέτρησης των αγγείων διαφέρουν σημαντικά. Οι περισσότερες βασίζονται στην επιλογή των "hot spots" όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο "Υλικό και Μέθοδοι".^{46,47} Λόγω της υποκειμενικότητας της επιλογής των "hot spots" οι μέθοδοι δεν είναι πλήρως αναπαραγώγιμες. Άλλωστε είναι δύσκολο να επιλεγούν ποια αγγεία θα μετρηθούν, το μέγεθος των αγγείων, ή εάν πρόκειται για διακλαδώσεις αγγείων τα οποία έχουν ήδη μετρηθεί.

Εμείς χρησιμοποιήσαμε την επιλογή των "hot spots" αλλά η καταμέτρηση έγινε σε μορφομετρικό σύστημα όπως περιγράφεται στο "Υλικό και Μέθοδοι", γεγονός που κάνει περισσότερο αντικειμενική την καταμέτρηση των αγγείων, όχι όμως και την επιλογή των "hot spots".

Ως όριο για να διαχωρίσουμε τα καρκινώματα με υψηλή και χαμηλή αγγειογένεση (cut-off) χρησιμοποιήσαμε τη διάμεση τιμή (Median), (Πίνακας 2) η οποία χρησιμοποιείται στις περισσότερες μελέτες.⁴⁵⁻⁴⁷ Σε άλλες μελέτες χρησιμοποιούν τη μέση τιμή (Mean) ή τη 75^η εκατοστιαία δέση^{40,45} ή συνεχείς παραμετρικές τιμές.⁴⁸

Αυξημένη MVD, βρέθηκε ότι σχετίζεται με την αύξηση της ιστολογικής διαβάθμισης, του σταδίου κατά Dukes και με χειρότερη επιβίωση και μάλιστα ότι αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα.⁴⁹⁻⁵¹ Στα Ο.Κ. της μελέτης, υψηλή MVD ήταν συχνότερη στις μεγα-

λύτερες ηλικίες και αυξανόταν σταδιακά από τα καρκινώματα σταδίου Dukes A στα Dukes C χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές, όπως και στη μελέτη των Bossi P και συν (1995)⁵². Στα Ο.Κ. με υψηλή MVD παρατηρήθηκε αύξηση του βαθμού πολλαπλασιαστικής δραστηριότητας, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική (NS).

Επίσης βρήκαμε ότι τα MMR(-) καρκινώματα παχέος εντέρου είχαν χαμηλή MVD σε σχέση με τα MMR(+) (p < 0,05). Η συσχέτιση μάλιστα ήταν ιδιαίτερα σημαντική για το MSH₂₋₁ και το MLH₁ στα οποία προέκυψαν 2 σαφείς υποομάδες κατά τον έλεγχο Duncan. Παρόλο ότι υπάρχουν αρκετές μελέτες που αφορούν την κατανομή της μικροδορυφορικής αστάθειας στα Ο.Κ., οι μελέτες που αφορούν μικροδορυφορική αστάθεια και κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους ή διάφορους κυτταρικούς δείκτες είναι περιορισμένες. Σε ό,τι αφορά την αγγειογένεση οι Wynter C και συν (1999)⁵³ βρήκαν ότι ο VEGF είναι ελαττωμένος στα MSI-H Ο.Κ. ενώ δεν βρήκαν συσχέτιση του CD31 και των MSI-H Ο.Κ.

Ο φυσικός τύπος του P₅₃ γονιδίου είναι ογκοκατασταλτικός και ο μεταλλαγμένος P₅₃ μπορεί να είναι ογκογόνος.⁵⁴ Λόγω της μεγαλύτερης ημιπεριόδου ζωής η παθολογική μεταλλαχθείσα πρωτεΐνη συσσωρεύεται και είναι ως εκ τούτου αναγνωρίσιμη ανοσοϊστοχημικά.⁵⁵ Αν και δεν υπάρχει πάντοτε αντιστοιχία μεταξύ της μετάλλαξης του P₅₃ γονιδίου και της συσσώρευσης της P₅₃ πρωτεΐνης, ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος είναι ένας γρήγορος εκτιμητής της αλλαγμένης λειτουργίας του P₅₃ και μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλες σειρές.^{55,56}

Μερικές μεταλλάξεις καταργούν την παραγωγή προϊόντος P₅₃ γονιδίου.⁵⁵ Επιπλέον αρκετοί όγκοι υπερεκφράζουν το προϊόν χωρίς να ταυτοποιείται μετάλλαξη του P₅₃ γονιδίου.⁵⁷ Υπάρχουν ογκογόνες δυσσυνθετικές (missense) μεταλλάξεις του P₅₃ γονιδίου που σχετίζονται με σταθεροποίηση του προϊόντος του γονιδίου και όχι με απουσία έκφρασης.⁵⁸

Οι ανοσοϊστοχημικές διαφορές στο ποσοστό δετικότητας της χρώσης στις διάφορες μελέτες και στην παρούσα μελέτη, μπορεί να οφείλονται εν μέρει στα διαφορετικά αντισώματα, στις μεθόδους χρώσης και στις μεθόδους αξιολόγησης. Το αντίσωμα D07 Ab το οποίο χρησιμοποιήσαμε και εμείς, αναγνωρίζει το φυσικό (wild) και το μεταλλαγμένο

(mutant) τύπο της P₅₃ πρωτεΐνης. Το γεγονός ότι χρησιμοποιήσαμε μέθοδο “ανάδειξης αντιγονικών επιτοπίων” μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα ψευδώς θετικό ποσοστό θετικότητας. Γι’ αυτό και τα καρκινώματα που είχαν ποσοστό θετικών πυρήνων έως 20% θεωρήσαμε ότι είχαν σχεδόν μηδενική έκφραση P₅₃ (Πίνακας 2). Τα ορθοκολικά καρκινώματα με ποσοστό θετικών πυρήνων μεγαλύτερο ή ίσο από 40% (διάμεση τιμή) θεωρήθηκαν ως P₅₃ θετικά. Αυτή η τιμή “cut-off” θεωρήθηκε σε διάφορες μελέτες ότι έχει την υψηλότερη συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης και των μεταλλάξεων του P₅₃ γονιδίου όταν χρησιμοποιείται μέθοδος “ανάδειξης αντιγονικών επιτοπίων” κατά την ανοσοϊστοχημική χρώση.⁵⁹⁻⁶² Τα Ο.Κ. που είχαν υψηλή έκφραση P₅₃ είχαν χειρότερη επιβίωση, τόσο 5ετή όσο και 10ετή, από εκείνα που είχαν αρνητική ή σχεδόν αρνητική έκφραση του P₅₃ (p < 0,05). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε αρκετές μελέτες.^{63-68,61,62} Αν και υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες για την έκφραση του P₅₃ και την εκτίμηση του πολλαπλασιασμού στα Ο.Κ. είναι ελάχιστες αυτές που συσχετίζουν το καθένα από αυτά ή και τα δύο μαζί με την ανοσοϊστοχημική εκτίμηση των MMR γονιδίων με πολυπαραγοντική ανάλυση.

Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι μια χρήσιμη παράμετρος στην εκτίμηση της βιολογικής συμπεριφοράς των όγκων, αν και η αξιοπιστία του ως προγνωστικού δείκτη δεν είναι σαφής στις διάφορες μεθόδους.

Οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν το PCNA αντίσωμα, και λιγότερο το BrdU και το Ki₆₇.⁶⁹⁻⁷⁴ Μέχρι πρόσφατα για τα BrdU και Ki₆₇ χρειαζόταν φρέσκος ή ψυγμένος ιστός. Τελευταία όμως, μια μορφή του αντισώματος Ki₆₇, MIB1 που χρησιμοποιήσαμε και στην παρούσα μελέτη, εφαρμόζεται με επιτυχία και σε τομές παραφίνης μετά από προεργασία των τομών για “ανάδειξη αντιγονικών επιτοπίων”.

Στις περισσότερες μελέτες, που αφορούν τομές παραφίνης, και κυρίως με το PCNA και ελάχιστες με το Ki₆₇, υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός νεοπλασματος και της κλινικής πορείας. Όμως τα αποτελέσματα των μελετών συμπεριλαμβανομένης και της παρούσης, για Ki₆₇, έχουν συχνά αποκλίσεις ή είναι αντιφατικά.⁷⁰⁻⁷⁵ Αυτό πιθανό να οφείλεται στο γεγονός ότι:

1. Η έκφραση του Ki₆₇ αντιγόνου φαίνεται ότι επηρεάζεται από την κατάσταση δρέψης ενός κυττάρου. Έτσι ιστός προερχόμενος από την

κεντρική περιοχή ενός μεγάλου όγκου πιθανό να δώσει εσφαλμένα χαμηλή τιμή του ρυθμού πολλαπλασιασμού.⁷⁴

2. Τα περισσότερα νεοπλασματα αποτελούνται από ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό, ενδεχομένως με διαφορετικούς δείκτες πολλαπλασιασμού. Έτσι η έκφραση του Ki₆₇ ενδέχεται να μην αντανακλά τον επικρατούντα δείκτη πολλαπλασιασμού ενός νεοπλασματος⁷⁶ και τα κύτταρα με μεταστατικό φαινότυπο να μην αξιολογούνται στις περισσότερες κινητικές μελέτες.⁷⁷
3. Ο θάνατος των νεοπλασματικών κυττάρων ενδέχεται να προσδέσει μια επιπλέον μεταβλητή.

Πολλοί μελετητές θεωρούν ότι η πιο αντιπροσωπευτική δέση σε όγκους με ετερογένεια, είναι η περιοχή των βαθύτερων διηθητικών ορίων του όγκου.^{72,74} Στη μελέτη μας προσπαθήσαμε η μορφομετρική εκτίμηση του Ki₆₇ να γίνει σε περιοχές μακριά από νεκρώσεις, εξελκώσεις και επιφανειακές δέσεις του όγκου, η επιλογή όμως των θέσεων ήταν υποκειμενική.

Ο.Κ. και πρόγνωση

Η σταδιοποίηση κατά T.N.M. και κατά Dukes αποτελούν αδιαμφισβήτητους ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες όπως αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία και όπως προέκυψε από την πολυπαραγοντική ανάλυση της παρούσης μελέτης.^{27,28,78-80}

Αυξημένη έκφραση της P53 πρωτεΐνης σχετίσθηκε με χειρότερη πρόγνωση στα Ο.Κ. με και μάλιστα στα MMR(+).

Στη μελέτη μας, η ανοσοϊστοχημική έκφραση του MLH₁ σχετίσθηκε με την πρόγνωση του Ο.Κ. και μάλιστα ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας. Παρομοίως, οι Cawkwell και συν. (1999)²³ βρήκαν καλλίτερη επιβίωση στα Ο.Κ. με απώλεια της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των MMR γονιδίων.

Οι Marcus V και συν (1999)²⁴ βρήκαν με ανοσοϊστοχημική εκτίμηση, ότι όγκοι με απενεργοποίηση του hMLH₁, ήταν συχνότερα σε περισσότερο διηθητικό στάδιο (T) σε σχέση με εκείνα που είχαν απενεργοποίηση του hMSH₂, χωρίς όμως να συσχετίσουν τα ευρήματα με την πρόγνωση.

Τα στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα για το MLH₁ σε σχέση με την παρατήρησή μας ότι η επιβίωση στα Ο.Κ. μειώνεται από τα MMR(-), στα MMR(±) και MMR(+) (NS) ενισχύουν την άποψη ότι τα γονίδια επιδιόρθω-

σης παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην καρκινογένεση, στην προσέγγιση των ασθενών με HMR-DS αλλά και στη κλινική πορεία της νόσου.

Από πρακτική άποψη, μελετώντας την ανοσοϊστοχημική έκφραση των MLH₁ και του MSH₂ (απώλεια έκφρασης) παράλληλα με την έκφραση του P₅₃ (μηδενική έκφραση) είναι πιθανόν, σε τυχαιοποιημένη μελέτη, εύκολα και φθηνά, να προσδιορίσουμε υποομάδα ορθοκολικών καρκινωμάτων με πιθανή υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια, τα οποία στην συνέχεια να μελετηθούν με μοριακές μεθόδους για την ανάδειξη εκείνων που πραγματικά έχουν υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια. Καθώς τα MSI-H O.K. εμφανίζουν όμοια κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά με τα καρκινώματα του HNPCC συνδρόμου, οι ασθενείς αυτοί θα πρέπει να διερευνώνται προς αποκλεισμό αυτού του κληρονομικού συνδρόμου. Επίσης οι ασθενείς με MSI-H καρκινώματα θα πρέπει στην συνέχεια να αντιμετωπισθούν με διαφορετική επικουρική θεραπεία, ενδελεχή έλεγχο για σύγχρονα καρκινώματα στο παχύ έντερο ή σε άλλα όργανα (στόμαχο, ενδομήτριο, ωοθήκες, ουροποιητικό σύστημα) αλλά και τακτικό πολυετή προληπτικό έλεγχο με κολονοσκοπήσεις και άλλες εξετάσεις για ανάπτυξη μετάχρονων νεοπλασμάτων. Οπωσδήποτε όμως χρειάζονται περισσότερες μελέτες με περισσότερες περιπτώσεις οι οποίες να συνοδεύονται από εκτίμηση της μικροδορυφορικής αστάθειας και με μοριακές μεθόδους.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 54:594-606, 1993.
- Wilms ABM MD. Overview of the Epidemiology of Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum* 40:483-493, 1997.
- Wingo P, Tong T, Bolden S. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 45:8-30, 1995.
- Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 44:7-26, 1994.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model of colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767, 1990.
- Boland CR. Roles of the DNA mismatch repair genes in colorectal tumorigenesis, review. *Int J Cancer* 69:47-49, 1996.
- Ionov Y, Peinado M, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558-561, 1993.
- Nicholaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann PD, Fraser CM, Adams MD, Venter JC, Dunlop MG, Hamilton SR, Petersen GM, de la Chapelle A, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutations of two PMS homologues in hereditary non polyposis colon cancer. *Nature* 371:75-80, 1994.
- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260:812, 1993.
- Cunningham C, Dunlop MG. Molecular genetic basis of colorectal cancer susceptibility. *Br J Surg* 83:321-329, 1996.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in Colorectal Cancers. *Nature* 386:623-627, 1997.
- Baba Shozo. Recent Advances in Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *World J Surgery* 21:678-687, 1997.
- Jass JR. Review: Diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Histopathology* 32:491-497, 1998.
- Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 53:5849-5852, 1993.
- Aebi S, Fink D, Gordon R, Kim HK, Zheng H, Fink JL, Howell SB. Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair deficient cells. *Clin Cancer Res* 3:10:1763-1767, 1997.
- Fink D, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Kim HK, Haas M, et al. The effect of different chemotherapeutic agents on the enrichment of DNA mismatch repair deficient tumor cells. *Br J Cancer* 77:703-708, 1998.
- Kim H, Jen J, Vogelstein B, et al. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 145:148-156, 1994.
- Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nystrom-Lathi M, Jarvinen HJ. Life time risk of different cancers in HNPCC syndrome. *Int J Cancer* 64:430-433, 1995.
- Lynch HT, Smyr KT. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome). *An Update Review Cancer* 78:1149-1157, 1996.
- Aaltonen LA, Salovaiva LA, Kristo P, Canzian F, Peltomaki P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 338:1481-1487, 1998.
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ET et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in

- young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 342: 69-77, 2000.
22. Wrigth CM, Dent OF, Barker M, et al. Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg* 1197-202, 2000.
 23. Cawkwell L, Gray S, Murgatroyd H, Dixon M, Quirke P, et al. Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective mismatch repair. *Gut* 45:409-415, 1999.
 24. Marcus V, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, Millar A. Immunohistochemistry for hMLH₁ and hMSH₂: A practical test for DNA Mismatch Repair Deficient tumors. *Am J Surg Pathol* 23(10):1248-1255, 1999.
 25. Chaves P, Cruz C, Lage P, Claro I, Cravo M, Leitao CN, Soares J. Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with mutator phenotype. *J Pathol* 191:355-360, 2000.
 26. Ward R, Meagher A, Tomilinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, Hawkins N. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut* 48:821-829, 2001.
 27. Dukes CE. Histologic grading of rectal carcinoma. *Proc R Soc Med* 30:371-376, 1937.
 28. UICC. TNM classification of malignant tumors. LH Sobin, Ch. Wittekind eds, 5th ed 1997.
 29. Compton C, Henson D, Hutter R, Sobin L, Bowman, for members of the Cancer Committee, College of American Pathologists. Updated Protocol for the Examination of specimens Removed from Patients with Colorectal Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 121:1247-54, 1997.
 30. Brown SR, Finan PJ, Cawkwell L, Quirke P, Biskop DT. Frequency of replication errors in colorectal cancer and their association with family history. *Gut* 43:553-557, 1998.
 31. Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 109:1685-1699, 1995.
 32. Kim H, Pia Z, Kim JW, Choi JS, Kim NK, Lee JM, Park JH. Expression of hMSH2 and hMLH1 in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Path Res Pract* 194:3-9, 1998.
 33. Cunningham JM, Christensen ER, Tester Dj et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 58:3455-60, 1998.
 34. Leach FS, Polyak K, Burrell M, Johnson KA, Hill D, Dunlop MG, Wyllie AH, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B. Expression of human mismatch repair gene hMSH₂ in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 56:235-240, 1996.
 35. Thibodeau SN, Freuch AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, Moslein G, Baker SM, Liskay M, Burgart LJ, Honchel R, Hallng KC. Altered expression of hMSH₂ and hMLH₁ in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res* 56:4836-4840, 1996.
 36. Kane MF, Lodo M, Gaida GM, et al. Methylation of the hMLH₁ promoter correlates with lack of expression of hMLH₁ in sporadic colon tumors and mismatch repair defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57:808-811, 1997.
 37. Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH. *Cancer Res* 58:1713-1718, 1998.
 38. Peltomaki P, Vasen HT. Mutations predisposing to Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The international Collaborative Group on H.NPC.C. *Gastroenterology* 113:1146-1158, 1997.
 39. Papadopoulos N, Lindblom A. A Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes. *Hum Mutat* 10:89-99, 1997.
 40. Bosari S, Viale G, Bossi P, Maggioni M, Coggi G, Murray JJ, Lee AK. Cytoplasmic accumulation of P₅₃ protein. An independent prognostic indicator in colorectal adenocarcinomas. *S Natl Cancer Inst* 86:681-687, 1994.
 41. Hamelin R, Laurent-Puig, Olschwang S, Jeco N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G. Association of P₅₃ mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 106:42-48, 1994.
 42. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260:816, 1993.
 43. Simms LA, Radford-Smith G, Biden KG, et al. Reciprocal relationship between the tumor suppressors P₅₃ and BAX in primary colorectal cancers. *Oncogene* 17:2003-2008, 1998.
 44. Cottu PA, Muzeau F, Estreicher A. Inverse correlation between RER+status and P₅₃ mutation in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 13:2727-2730, 1995.
 45. Martin L, Green B, Renshaw C, Lowe D, Rudland P, Leinster SJ, Winstanley J. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer* 76:18, 1997.
 46. Weidner N, Semple J, Welch W, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *The New Engl Medicine* 324:1-8, 1990.

47. Fox S, Leek R, Weekes M, Whitehouse R, Gatter K, Harris A. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis. Comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J of Pathol* 177:275-283, 1995.
48. Vermeulen PB, Verhoeven D, Hubens G, et al. Microvessel density, endothelial cell proliferation and tumor cell proliferation in human colorectal adenocarcinomas. *Ann Oncol* 6:59-64, 1995.
49. Engel CJ, Bennett S, Chambers AF, Doig GS, et al. Tumor angiogenesis Predicts Recurrence in Invasive Colorectal Cancer when controlled for Dukes Staging. *Am J Surg Pathol* 20(10): 1260-1265, 1996.
50. Takebayashi Y, Akiyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T. Angiogenesis as an Unfavorable Prognostic Factor in Human Colorectal Carcinoma. *Cancer* 78:226-231, 1996.
51. Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiobanou E, Papadimitriou C, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 86:1421-1430, 1999.
52. Bossi P, Viole G, Lee AKC, Aftano R, Coggi G, Bossari S. Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitations correlations. *Cancer Res* 55:5049-5053, 1995.
53. Wynter C, Simms L, Buttenshaw R, et al. Angiogenic factor VEGF is decreased in human colorectal neoplasms showing DNA microsatellite instability. *J Pathol* 189:319-325, 1999.
54. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The P₅₃ protooncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57:1083-93, 1989.
55. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the P₅₃ tumor suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329:1318-1327, 1993.
56. Soong R, Robbins PD, Dix BR, Grieco F, et al. Concordance between p53 protein overexpression and gene mutation in a large series of common human carcinomas. *Hum Pathol* 27:10: 1050-55, 1996.
57. Wynford-Thomas O. P₅₃ in tumor pathology: Can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 166:329-330, 1992.
58. Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant P₅₃ gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 172:5-12, 1994.
59. Grizzle WE, Myers RB, Manne U, and Crivastara S. Evaluation of Biomarkers in prostatic and colorectal neoplasia: *Methods Mol Biol* 19:259-264, 1994.
60. Grizzle WE, Myers RB, Oelschlagel DK. Prognostic biomarkers in breast cancer factors affecting immunohistochemical evaluation. *Breast* 1:243-250, 1995.
61. Manne U, Myers R, Moron C, Poczatek R, Dillard St, Weiss H, Brown D, Srivastava S, Grizzle W. Prognostic significance of bcl-2 expression and P₅₃ nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 74:346-358, 1997.
62. Baretton GB, Vogt M, Diebold J. Prognostic significance of p53 expression, chromosome 17 copy number and DANN ploidy in non metastasized colorectal carcinomas (stage IB and II). *Scand J Gastroenterol* 31:481-89, 1996.
63. Remvikos Y, Tominaga O, Mammel P et al. Increased P53 protein content of colorectal tumors correlates with poor survival. *Br J Cancer* 66:758-764, 1992.
64. Bell SM, Scott N, Cross D et al. Prognostic value of P₅₃ overexpression and k-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 104:57-64, 1993.
65. Hamelin R, Laurent[puig Olschwang S, Jego N, Asselain B, Rembikos Y et al. Association of p53 mutations with shirt survival in colorectal cancer. *Gastroenterol* 106:42-48, 1994.
66. Zeng ZS, Sarkis AS, Zhang ZF, Klimstra DS, Charytonowicz E et al. P₅₃ nuclear overexpression. An independent predictor of survival in lymph node-positive colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 12:2043-2050, 1994.
67. Lazaris A, Theodoropoulos G, Anastossopoulos P, Nakopoulou L, Panoussopoulos D, Papadimitriou K. Prognostic significance of p53 and c-erb-2 immunohistochemical evaluation in colorectal adenocarcinoma. *Histol Histopathol* 10: 661, 1995.
68. Yamaguchi A, Kurosaka Y, Fushida S, Kanno M, Yonemura Y, Miwa K, Miyazaki I. Expression of P₅₃ protein in colorectal cancer and its relationship to short-term prognosis. *Cancer* 70:2778-2784, 1992.
69. Choi HJ, Jung K, Kim SS, Hong. Proliferating cell Nuclear Antigen Expression and its relationship to malignancy potential in invasive colorectal carcinomas. *Dis Colon Rectum* 40:51-59, 1997.
70. Suzuki H, Matsumoto K, Terabe M. Ki₆₇ antibody labeling index in colorectal carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 15:317-320, 1992.
71. Porschen R, Iohe B, Hengerls KJ, Borchard F. Assessment of cell proliferation in colorectal carcinomas using the monoclonal antibody Ki₆₇ correlation with pathohistologic criteria and influence of irradiation. *Cancer* 64:2501-2505, 1989.

72. Shepherd NA, Richman PI, England J. Ki₆₇ derived proliferative activity in colorectal adenocarcinoma with prognostic correlations. *J Pathol* 155:219-219, 1988.
73. Al Sheneber F, Shibata HR, Sampalis J, Jothy S. Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen expression in colorectal cancer. *Cancer* 71:1954-1959, 1993.
74. Teixeira CR, Tanaka S, Haruma K, Yashihara M, Sumii K, Kajiyama G. Proliferating cell nuclear antigen expression at the invasive tumor margin predicts malignant potential of colorectal carcinomas. *Cancer* 73:575-579, 1994.
75. Kyzer S, Gordon PH. Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma with monoclonal antibody Ki 67. *Dis Colon Rectum* 40(3):322-325, 1997.
76. Nowell PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* 46:2203-2207, 1989.
77. Frost P, Levin B. Clinical implications of metastatic process. *Lancet* 339:1458-1461, 1992.
78. Calaluce R, Miedema BW, Yesus YW. Micrometastasis in colorectal carcinoma; a review; *J Surg Oncol* 67:194-202, 1998.
79. Shepherd NA. Pathological prognostic factors in colorectal cancer. In: *Progress in pathology vol 2*, Kirham-NR Lemoine eds pp 115-141, 1995.
80. Hermanek P. Tumors of gastrointestinal tract and pancreas: Histopathology, staging and prognosis. *Anticancer Res* 19:2393-2396, 1999.

Corresponding author:

Meditskou Soutana, MD

29 Alkminis str., 54249 Thessaloniki

Tel: +302310307360, Fax: +302310908311

e-mail: toulg@otenet.gr

Υπεύθυνος αλληλογραφίας

Μεδίτσκου Σουλτάνα, MD

Αλκμίνης 29, 54249 Θεσσαλονίκη

Τηλ: +302310307360, Fax: +302310908311

e-mail: toulg@otenet.gr