

Κλινική και ανοσοϊστοχημική μελέτη του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα σε Έλληνες ασθενείς

Μπατισιάτου Α., Γιαννάτος Δ., Στεφάνου Δ., Δήμου Σ., Αγκνάντη Ν.Ι.

Clinical and immunohistochemical study of nasopharyngeal carcinoma in Greek patients

Batistatou A., Giannatos D., Stefanou D., Dimou S., Agnantis N.I.
Department of Pathology, University of Ioannina Medical School

AIM: Nasopharyngeal carcinoma is a malignant neoplasm with characteristic racial and geographic distribution. Its development involves cumulative genetic and epigenetic changes in a background of genetic and environmental factors. The aim of this study was to examine the epidemiological characteristics and clinical course and to investigate predisposing and environmental factors for the development of nasopharyngeal carcinoma in Greek patients, as well as to correlate this malignancy with the expression of oncoproteins p21 ras, p53, c-erb-B2, and proliferation index Ki67.

MATERIALS AND METHODS: We present a retrospective study in 81 patients with nasopharyngeal carcinoma regarding the analysis of the clinical course of the disease after appropriate therapy and in 42 patients regarding the immunohistochemical expression of ras p21, p53, c-erb-B2 and Ki67.

RESULTS-CONCLUSIONS: Smoking, positive family history and diet do not appear to be predisposing factors for the development of nasopharyngeal carcinoma in Greek patients. The patients who have been treated for nasopharyngeal carcinoma have higher 5- and 10-year survival rates compared with patients of Southeast Asia, where most studies have been conducted. Younger patients and females have higher survival rates than older patients and males. Immunohistochemical staining for oncoproteins ras p21, p53, c-erb-B2 and for Ki67 exhibited reduced intensity, compared with the international literature data. This fact could account for the better prognosis of Greek patients. This hypothesis must be substantiated with larger series of patients, however this is difficult due to the rarity of this malignancy in Greece.

Key words: nasopharynx, ras p21, p53, c-erb-B2, ki67

ΣΚΟΠΟΣ: Το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα είναι ένα κακόηδες νεόπλασμα με χαρακτηριστική φυλετική και γεωγραφική κατανομή. Η ανάπτυξη του εμπλέκει αδροιστικές γενετικές και επιγενετικές αλλαγές πάνω σε ένα υπόστρωμα προδιαθεσικών γενετικών και επιγενετικών παραγόντων. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η μελέτη των επιδημιολογικών χαρακτηριστικών και της κλινικής πορείας, η αναζήτηση προδιαθεσικών και περιβαλλοντικών παραγόντων για την ανάπτυξη του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα στους Έλληνες ασθενείς, καθώς και ο συσχετισμός της νόσου αυτής με την p21 πρωτεΐνη του γονιδίου ras, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, το ογκογονίδιο c-erb-B2, και το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ: Παρουσιάζεται μια αναδρομική μελέτη σε 81 ασθενείς με καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα σε ότι αφορά την κλινική ανάλυση της πορείας της νόσου έπειτα από θεραπεία και σε 42 ασθενείς σε ό,τι αφορά την ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης των γονιδίων ras p21, p53, c-erb-B2 και του δείκτη Ki67.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Για τους Έλληνες ασθενείς δεν φαίνεται να παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα το κάπνισμα, το δετικό οικογενειακό ιστορικό της νόσου και η διατροφή. Οι Έλληνες ασθενείς με καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε θεραπεία έχουν μεγαλύτερη πενταετή και δεκαετή επιβίωση, συγκριτικά με τους ασθενείς της Ν.Α. Ασίας, στους οποίους έχουν γίνει οι περισσότερες μελέτες. Οι ασθενείς μικρότερης ηλικίας και οι γυναίκες έχουν μεγαλύτερη επιβίωση από τους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας και τους άνδρες. Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τις ογκοπρωτεΐνες ras p21, p53, c-erb-B2 και το Ki67 είχαν μικρότερη ένταση απ' ό,τι αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία για τους ίδιους παράγοντες, γεγονός το οποίο έχει πιθανότητα να κάνει και με την καλύτερη πρόγνωση των Ελλήνων ασθενών, αν και αυτό πρέπει να αποδειχθεί και με μεγαλύτερες σειρές ασθενών, πράγμα δύσκολο λόγω της σπανιότητας της νόσου στην Ελλάδα.

Λέξεις-κλειδιά: ρινοφάρυγγας, ras p21, p53, c-erb-B2, ki67

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με τα στοιχεία της Εθνικής Στατιστικής Υπηρεσίας, το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα στην Ελλάδα, αντιπροσωπεύει το 0,4% του συνόλου των καρκίνων, προσβάλλοντας 6 κατοίκους ανά εκατομμύριο, ενώ η συχνότητα για τη Ν.Α. Ασία και συγκεκριμένα για το Hong-Kong είναι 124 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο καθιστώντας το έτσι την πρώτη αιτία καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου¹.

Σαν κυριότερη αιτία δημιουργίας καρκινώματος του ρινοφάρυγγα αναφέρονται ο ιός Epstein Barr (EBV), ο πρώιμος απογαλακτισμός και η κατανάλωση παστών ψαριών, σε συνδυασμό με έλλειψη βιταμίνης C, των νεαρών κατοίκων της Ν.Α. Ασίας, καθώς και η γενετικώς προσδιοριζόμενη ευπάθεια των ίδιων ασθενών¹⁻⁵.

Το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα είναι επιδημιολογικός όγκος και σύμφωνα με την Παγκό-

σμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization, WHO) υποδιαιρείται σε τρεις κυρίως κατηγορίες. Οι όγκοι από πλακώδες επιθήλιο οι οποίοι παρουσιάζουν κερατινοποίηση (τύπος WHO 1) απαντώνται συχνότερα στις μεγαλύτερες ηλικίες και έχουν μικρή συσχέτιση με τον EBV, ενώ οι μη κερατινοποιούμενοι όγκοι απαντώνται σε μικρότερες ηλικίες, συσχετίζονται σε ποσοστό από 90% ως 100% με τον EBV και χωρίζονται ιστολογικά σε διαφοροποιημένους (τύπος WHO 2) και σε αδιαφοροποίητους (τύπος WHO 3)⁶.

Η κύρια θεραπευτική μέθοδος για το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα είναι η ακτινοθεραπεία μεγάλου πεδίου ακτινοβολίας με ή χωρίς λεμφαδενικό καθαρισμό, ενώ τα τελευταία χρόνια σημαντικό ρόλο αρχίζει να έχει και η χειρουργική της βάσεως του κρανίου για την αντιμετώπιση της πρωτοπαθούς εστίας για όγκους σταδίου III και της τοπικής υποτροπής, μετά από ακτινοθεραπεία σε συνδυασμό

με τις άλλες μορφές θεραπειάς⁷.

Σκοπός αυτής της αναδρομικής εργασίας είναι η μελέτη των επιδημιολογικών χαρακτηριστικών, της κλινικής πορείας, η αναζήτηση προδιαθετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων για την ανάπτυξη του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα στους Έλληνες ασθενείς, καθώς και ο συσχετισμός της νόσου αυτής με την έκφραση των γονιδίων *ras p21*, *p53*, *c-erb-B2* και το δείκτη *Ki67*.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Υλικό

Για την κλινική στατιστική μελέτη βρέθηκαν οι φάκελοι 81 διαγνωσμένων περιστατικών καρκινώματος του ρινοφάρυγγα από τρία μεγάλα Νοσοκομεία της χώρας, από το Ελληνικό Αντικαρκινικό Ινστιτούτο της Αθήνας, ΠΟΑΝΑ "Ο Άγιος Σάββας", από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων (ΠΓΝΙ) και από το ΑΧΕΠΑ Θεσσαλονίκης για την περίοδο 1978-1995. Οι 59 ασθενείς ήταν άνδρες και οι 22 γυναίκες και η ηλικία τους κυμαινόταν από 14 έως 86 χρόνων. Από αυτά τα περιστατικά, λόγω διασποράς των ασθενών, κατέστη δυνατό να γίνει λεπτομερής αναδρομική μελέτη της κλινικής πορείας σε 45. Οι ασθενείς αυτοί ή το περιβάλλον τους απάντησαν δι' αλληλογραφίας σε ένα ερωτηματολόγιο το οποίο αφορούσε το οικογενειακό και ατομικό τους αναμνηστικό, αν κάπνιζαν και πόσο, τις διατροφικές τους συνήθειες, την αρχική εκδήλωση και την πορεία της νόσου. Από τους 45 ασθενείς υπό παρακολούθηση οι 21 προσήλθαν για πρώτη φορά στα στάδια IV και V και οι υπόλοιποι 24 στα στάδια I, II, και III, κατά Ho, όπως συμπεράναμε από την αναδρομική μελέτη των φακέλων και από το ερωτηματολόγιο το οποίο επέστρεψαν οι ασθενείς. Διαγνωσμένα αδενοκαρκινώματα (n=2) και λεμφώματα του ρινοφάρυγγα (n=3) αποκλείστηκαν από τη μελέτη λόγω διαφορετικής επιδημιολογίας.

Οι ιστολογικοί τύποι του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα ταξινομήθηκαν σύμφωνα με την WHO και κατά τους Shanmuragatham και Sobin⁸ με βάση τους κώδικες της ICD-O (International Classification of Disease-Oncology). Τα αδιαφοροποίητα, τα αναπλαστικά και τα λεμφοεπιδηλιακά καρκινώματα (ICD-O κώδικες 8020, 8021, 8082 και 8073) ταξινομήθηκαν ως μη κερατινοποιούμενα καρκινώματα.

Τα καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο (ICD-O κώδικες 8070, 8071) σχημάτισαν την ομάδα των καρκινωμάτων από πλακώδες επιθήλιο. Μελέτη με βάση τη φυλετική προέλευση των ασθενών δεν έγινε, καθώς δεν υπάρχουν τέτοια δημογραφικά στοιχεία για την Ελλάδα.

Όλοι οι ασθενείς είχαν ιστολογική επιβεβαίωση της παθήςέως τους με λήψη βιοψίας από τον πρωτοπαθή όγκο του ρινοφάρυγγα. Η παρακολούθηση των ασθενών έγινε κατά διαστήματα διάρκειας περίπου 24 μηνών και η μέση χρονική διάρκεια της παρακολούθησης όλης της ομάδας των 44 ασθενών ήταν 64 μήνες.

Μέθοδος

Όλοι οι ασθενείς είχαν υποβληθεί σε λήψη βιοψιών από την περιοχή του ρινοφάρυγγα, πριν ξεκινήσουν ακτινοθεραπεία. Η ανοσοϊστοχημική μελέτη έγινε σε υλικό παραφίνης 40 ασθενών για τα *ras p21* και *p53* και 42 ασθενών για τα *c-erbB-2* και *Ki67*. Για την ταυτοποίηση των ανοσοσφαινοτυπικών χαρακτηριστικών των όγκων και την έκφραση των ογκογονιδίων-ογκοσταλτικών γονιδίων και του δείκτη πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα: για το *ras p21* το μονοκλωνικό AB-1 (Oncogene Science, Βιοδυναμική), για το *p53* το μονοκλωνικό DO-7 (Oncogene Science, Βιοδυναμική), για το *c-erbB-2* το μονοκλωνικό CB11 (IgG1, NOVOCASTRA Labs, Newcastle Upon Tyne, UK) και για το *Ki67* το μονοκλωνικό αντίσωμα MIB1 (NOVOCASTRA Labs, Newcastle Upon Tyne, UK).

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή του συμπλέγματος της αβιδίνης-βιοτίνης με DAB ως χρωμογόνο.

Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές παραφίνης από τους ίδιους όγκους, οι οποίες χρώσθηκαν με την ίδια ακριβώς μέθοδο, παραλείποντας όμως το πρωτογενές αντίσωμα και αντικαθιστώντας το με ένα μη ανοσοορό.

Σε ό,τι αφορά τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με τη χρήση του αντισώματος *ras p21*, αυτά εκτιμήθηκαν με βάση τόσο το ποσοστό των δετικών κυττάρων του όγκου, όσο και την ένταση της χρωστικής αντίδρασης. Το ποσοστό των δετικών κυττάρων του όγκου εκτιμήθηκε με την μέτρηση 10 οπτικών πεδίων μεγάλης μεγέθυνσης (10 ΟΠΜΜ) και επί τοις εκατό καταγραφή των δετικών νεοπλασματικών κυττάρων. Με βάση το ποσοστό

αυτό η ανοσοχρώση θεωρήθηκε αρνητική ή ασθενής (<25%), μέτρια (>25-75%) και έντονα (>75%) θετική. Η ένταση της χρωστικής αντίδρασης διαβαδμίστηκε ως αρνητική ή ασθενής (+/-), όταν ήταν ανάλογη των αρνητικών μαρτύρων, μέτρια θετική (+) και έντονα θετική (++).

Ανάλογα με το ποσοστό των θετικών κυττάρων (πυρηνική χρώση) η έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 εκτιμήθηκε σε 10 ΟΠΜΜ ως αρνητική (<10%), μέτρια (10-50%) και έντονα (>50%) θετική. Ανάλογα με την ένταση της χρωστικής αντίδρασης οι όγκοι χαρακτηρίστηκαν αρνητικοί (-), μέτρια θετικοί (+) και έντονα θετικοί (++).

Η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για την ογκοπρωτεΐνη c-erb-B2, καθορίστηκε με βάση το πρότυπο ανοσοχρώσης στο συγκεκριμένο δείγμα και σύμφωνα με μια ημιποσοτική διαβάδμιση σε 10 ΟΠΜΜ. Τα αποτελέσματα διαβαδμίστηκαν ως αρνητικά (<25%), ως μέτρια θετικά (25-50%) και ως έντονα θετικά (>50%), ανάλογα με την ένταση της ανοσοχρώσης της κυτταρικής μεμβράνης.

Τέλος, για το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 εκτιμήθηκε η θετική πυρηνική χρώση των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με το συνολικό αριθμό (περίπου 1.000 κύτταρα) των καρκινικών κυττάρων σε 10 ΟΠΜΜ. Κάθε πυρήνας με χρώση θεωρήθηκε θετικός, ανεξάρτητα από την ένταση της χρωστικής αντίδρασης. Η εκατοστιαία αναλογία των καρκινικών κυττάρων με θετική χρώση ορίστηκε ως δείκτης σημασίας του Ki67. Τα αποτελέσματα διαβαδμίστηκαν ως χαμηλός (<10%) και υψηλός δείκτης (>10%).

Οι υπολογισμοί της κλινικής μελέτης και οι συσχετισμοί με τις στατιστικές αναλύσεις έγιναν σύμφωνα με τους πίνακες του προγράμματος SPSS (Statistical packages for social sciences).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά και κλινική πορεία

Από τους αρχικούς 81 Έλληνες ασθενείς οι 59 ήταν άνδρες και οι 22 γυναίκες, (Α/Γ=2,6/1). Τέσσερις (4,9%) είχαν κερατινοποιούμενο καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο, 64 (79%) είχαν διαφοροποιημένο - μη κερατινοποιούμενο καρκίνωμα και οι υπόλοιποι 13 είχαν αδιαφοροποίητο καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα (16%). Η ηλικία των ασθενών κυμαινό-

ταν από 14 έως 86 χρόνων με μέσο όρο εμφάνισης της νεοπλασίας τα 55,8 (±15,2) χρόνια, ενώ παρατηρήθηκαν δύο κατανομές ηλικιών με αυξημένη επίπτωση του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα κατά την 4^η και κατά την 7^η δεκαετία της ζωής.

Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη επίπτωση του αδιαφοροποίητου τύπου στις μικρότερες ηλικίες, ενώ ο διαφοροποιημένος-μη κερατινοποιούμενος τύπος καρκινώματος εμφάνισε αύξηση της επίπτωσής του σε μεγαλύτερες ηλικίες και συγκεκριμένα στην 7^η και 8^η δεκαετία της ζωής. Η αξιολόγηση των δεδομένων για τα καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο δεν ήταν στατιστικά σημαντική σ' αυτή τη μελέτη λόγω του μικρού αριθμού τους.

Ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης του τύπου WHO-1 ήταν τα 51,5 (±18) χρόνια, του τύπου WHO-2 ήταν τα 57,7 (±18) χρόνια και του τύπου WHO-3 ήταν τα 53 (±16,4) χρόνια. Και οι τρεις τύποι του καρκινώματος εκδηλώνονται στις Ελληνίδες ασθενείς σε μικρότερες ηλικίες. Συγκεκριμένα, για τους τύπους WHO-1 και WHO-2 ο μέσος όρος ηλικίας εμφάνισης ήταν τα 47 χρόνια (47±10 και 47,2±18 αντίστοιχα), ενώ για τον τύπο WHO-3 ήταν τα 51 (±18) χρόνια. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης κάποιου συγκεκριμένου ιστολογικού τύπου ανά φύλο (p<0,173). Οι ασθενείς μικρότερης ηλικίας έχουν μεγαλύτερη επιβίωση από τους ασθενείς μεγαλύτερης ηλικίας.

Η 5ετής επιβίωση του συνόλου των 45 ασθενών μετά την ακτινοθεραπεία ήταν 57,8% για την πρώτη και 45,5% για τη δεύτερη 5ετία. Μέχρι την πρώτη 15ετία δεν υπήρξε απόκλιση στις τιμές επιβίωσης από τη δεύτερη 5ετία. Ο τύπος WHO-3 εμφάνισε ποσοστό επιβίωσης 58,6% για την πρώτη 5ετία και 49,6% για την δεύτερη 5ετία και ο τύπος WHO-2 εμφάνισε ποσοστά 50% και 31,8% αντίστοιχα.

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των τσιγάρων ανά ημέρα και της ανάπτυξη καρκινώματος του ρινοφάρυγγα, ούτε μεταξύ ατομικού και οικογενειακού αναμνηστικού των ασθενών με την μετέπειτα ανάπτυξη της νεοπλασίας αυτής, καθώς και με τις συνήθειες διατροφής των ασθενών.

Ανοσοϊστοχημική μελέτη

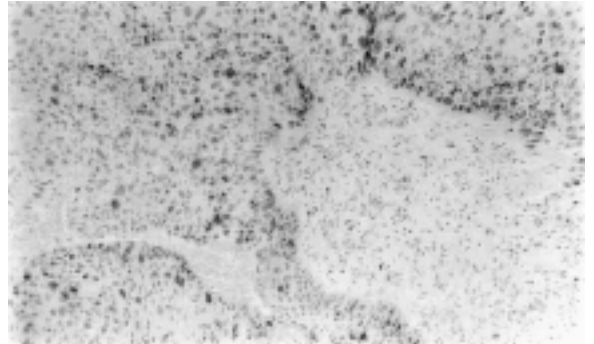
Η ογκοπρωτεΐνη ras p21 ανιχνεύτηκε ανοσοϊστοχημικά στο 52,5% των περιπτώσεων ανε-

ξαρτήτως ιστολογικού τύπου (Πίν. 1, Εικ. 1).

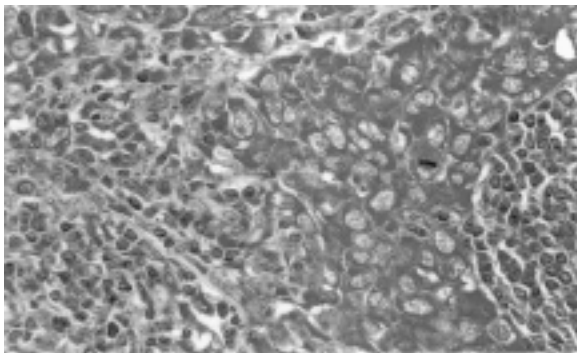
Σε ότι αφορά την ανοσοχρώση του p53, 45% των όγκων είχαν δετική χρώση μέτριας και έντονης έντασης (Πίν. 1, Εικ. 2). Η ανοσοχρώση για το p53 στα καρκινώματα από πλακώδες επιθήλιο ήταν αρνητική, ενώ στα μη κερατινοποιούμενα και αδιαφοροποίητα καρκινώματα του ρινοφάρυγγα ήταν δετική στις μισές περίπου περιπτώσεις. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του φύλου, της ηλικίας και του καπνίσματος και της έντασης των ανοσοχρώσεων για τις ογκοπρωτεΐνες ras p21 και p53. Δεν κατέστη δυνατό να γίνει στατιστική μελέτη μεταξύ της πενταετούς επιβίωσης των ασθενών και των εντάσεων των ανοσοχρώσεων λόγω του μικρού δείγματος.

Η ανοσοχρώση για το c-erb-B2 ήταν δετική στο σύνολο των περιπτώσεων. Συγκεκριμένα το 88% των όγκων είχε μέτριας έντασης και το 12% είχε έντονης έντασης δετική ανοσοχρώση. Όλοι όμως οι ασθενείς με τον αδιαφοροποίητο τύπο της νόσου είχαν όγκους με ανοσοχρώση μέτριας εντάσεως, ενώ ασχέτως ιστο-

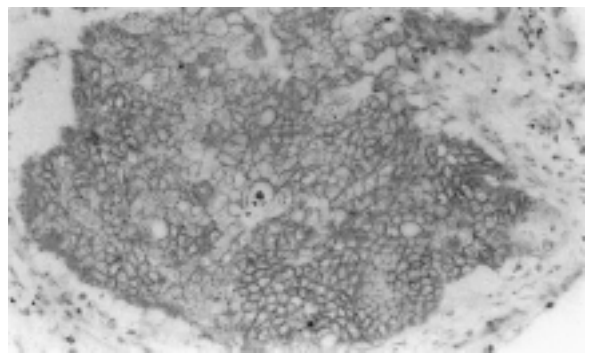
λογικού τύπου, όλοι οι ασθενείς με όγκους με μέτριας έντασης δετική ανοσοχρώση βρέθηκε να έχουν μεγαλύτερο ποσοστό πενταετούς επιβίωσης απ' ότι οι ασθενείς με έντονα δετική ανοσοχρώση (Πίν. 1, Εικ. 3). Συγκεκριμένα, με τις καμπύλες επιβίωσης οι Έλληνες ασθενείς με ανοσοχρώση c-erb-B2 μέτριας έντασης



Εικόνα 2. Μέτριας έντασης πυρηνική ανοσοχρώση για την ογκοπρωτεΐνη p53 σε διαφοροποιημένο, μη κερατινοποιούμενο καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα (DAB x200).



Εικόνα 1. Έντονη ανοσοχρώση για την ογκοπρωτεΐνη ras p21 σε διαφοροποιημένο, μη κερατινοποιούμενο καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα (DAB x400).



Εικόνα 3. Έντονη μεμβρανική ανοσοχρώση για την ογκοπρωτεΐνη c-erb-B2 σε διαφοροποιημένο, μη κερατινοποιούμενο καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα (DAB x400).

Πίνακας 1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση των ογκοπρωτεϊνών ras p21, p53 και c-erb-B2 σε καρκινώματα του ρινοφάρυγγα σε Έλληνες ασθενείς.

Ογκοπρωτεΐνη	Ένταση της χρωστικής αντίδρασης			Αριθμός δειγμάτων
ras p21	(+/-) <25%	(+)25-75%	(++) >75%	40
	19	14	7	
p53	(-) <10%	(+)10-50%	(++) >50%	40
	22	9	9	
c-erb-B2	(-) <25%	(+) 25-50%	(++) >50%	42
	0	37	5	

βρέθηκε να έχουν πενταετή επιβίωση 70% και δεκαετή επιβίωση 30%, ενώ οι καμπύλες επιβίωσης για τους ασθενείς με έντονη δετική ανοσοχρώση ήταν μόνον 20% για τις δύο χρονικές περιόδους αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκε στατιστική σχέση μεταξύ της έντασης της ανοσοχρώσης για το c-erb-B2 και της ηλικίας, του φύλου και του ιστορικού καπνίσματος των ασθενών.

Ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος για το δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 ανέδειξε μεγάλη ετερογένεια της πυρηνικής ανοσοχρώσης. Στους 32 ασθενείς με καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο (WHO-1) και καλά διαφοροποιημένο - μη κερατινοποιούμενο καρκίνωμα (WHO-2), το 50% είχαν χαμηλό και το 50% είχαν υψηλό δείκτη, ενώ όλοι οι ασθενείς με αδιαφοροποίητο καρκίνωμα είχαν χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα της μελέτης στους Έλληνες ασθενείς σχηματίζεται η εντύπωση ότι το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα είναι μια χρόνια πάθηση για όσους ξεπεράσουν την πιθανότητα θανάτου κατά την πρώτη πενταετία (57,8%), γιατί η δεύτερη και η τρίτη πενταετία εμφανίζουν το ίδιο ποσοστό επιβίωσης (45,5%). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μελέτης του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα στην Ελλάδα με αυτά άλλων χωρών βλέπουμε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά από τα αποτελέσματα σε ασθενείς της λευκής φυλής άλλων χωρών, ενώ μικρές διαφορές παρατηρούνται σε ασθενείς της κίτρινης και μαύρης φυλής, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία¹⁻³. Συνοπτικά, οι Κινέζοι ασθενείς έχουν μικρότερο μέσο όρο ηλικίας εμφάνισης της νόσου και καλύτερη πρόγνωση, ενώ οι μαύροι ασθενείς έχουν χειρότερη πρόγνωση ανεξαρτήτως της ηλικίας εμφάνισης¹⁻³.

Σε ότι αφορά την παθογένεια του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα, η αναφερόμενη επίπτωση των μεταλλάξεων του ογκογονιδίου ras p21 στους όγκους κεφαλής και τραχήλου δείχνει να έχει γεωγραφική κατανομή, η οποία οφείλεται πιθανότατα στις διαφορετικές φυλές των ασθενών, στις διαφορετικές συνήθειες διατροφής, στον τρόπο καπνίσματος και στον τρόπο διαβίωσης. Στην Ινδία, το 35% των καρκινωμάτων από πλακώδες επιθήλιο παρουσιάζει μετάλλαξη στο γονίδιο ras p21, ενώ στο Δυτικό

Ημισφαίριο οι μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο είναι λιγότερες από 5%^{9,10}. Η υπερπαραγωγή/υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης p21 είναι ένα συνηθισμένο φαινόμενο στους καρκίνους της κεφαλής και του τραχήλου¹¹⁻¹⁵. Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι τα δείγματα των καρκινωμάτων του ρινοφάρυγγα των Ελλήνων ασθενών έχουν δετική χρώση για την ογκοπρωτεΐνη ras p21 σε ποσοστό 52,5%. Μία παρόμοια μελέτη σε Κινέζους ασθενείς από τους Porter και συν. έδειξε ποσοστό δετικότητας 76% για την ras p21, η οποία δεν σχετίζεται με την πρόγνωση και την επιβίωση¹⁵.

Το 45% των Ελλήνων ασθενών βρέθηκε να έχει δετική ανοσοχρώση για το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53, ποσοστό μικρότερο από το αναφερόμενο στη βιβλιογραφία, περίπου 70%, επί Κινέζων ασθενών¹⁶. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με ιστορικό καπνίσματος, ενώ λόγω μικρού δείγματος δεν κατέστη δυνατό να γίνει στατιστική μελέτη για συσχέτιση μεταξύ της ανοσοχρώσης του p53 και της πενταετούς επιβίωσης των ασθενών. Παρόμοια μελέτη των Porter και συν. επί Κινέζων ασθενών, έδειξε ότι το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 δεν αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα¹⁶.

Όπως και για το ras p21, έτσι και για την ογκοπρωτεΐνη p53 φαίνεται ότι η απενεργοποίησή τους οφείλεται σε γενετικές αλλαγές, πιθανότητα σε μεταλλάξεις συγκεκριμένων εξονίων του γενετικού υλικού των κυττάρων του ρινοφάρυγγα των ασθενών, αν και αυτό φαίνεται να γίνεται σε πολύ μικρή συχνότητα και σε υποομάδες καρκινικών κυττάρων¹⁷. Επίσης, αν και ανιχνεύεται αύξηση των επιπέδων της ογκοπρωτεΐνης p53, μεταλλάξεις του γονιδίου p53 στο καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα δεν είναι τόσο συχνές όσο στους καρκίνους από πλακώδες επιθήλιο άλλων περιοχών της κεφαλής και του τραχήλου¹⁸⁻²⁷.

Όλα τα δείγματα των βιοψιών είχαν δετική ανοσοχρώση για το ογκογονίδιο c-erb-B2, και οι ασθενείς των οποίων η ανοσοχρώση ήταν μέτρια δετική βρέθηκαν να έχουν μεγαλύτερο ποσοστό πενταετούς επιβίωσης απ' ό,τι εκείνοι που είχαν έντονα δετική ανοσοχρώση, αποτέλεσμα που δείχνει ότι η έκφραση του ογκογονιδίου c-erb-B2 ίσως αποτελεί ένα σημαντικό προγνωστικό παράγοντα για το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα στην Ελλάδα. Ωστόσο, σημειώνουμε ότι ο αριθμός των ασθενών με έντονη έκφραση είναι μικρός για να εξαχθούν ασφα-

λή συμπεράσματα Η ίδια ογκοπρωτεΐνη αποτελεί επίσης προγνωστικό παράγοντα και για άλλους καρκίνους, όπως του μαστού, του τραχήλου της μήτρας από πλακώδες επιθήλιο, του μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα, του καρκινώματος του στομάχου και των σιελολογόνων αδένων και του οισοφάγου²⁸⁻³³. Τα αποτελέσματα μας αποτελούν ένδειξη ότι η ένταση της έκφρασης του ογκογονιδίου c-erbB2 μπορεί να βοηθήσει στην ανεύρεση εκείνων των ασθενών με μικρότερο προσδοκώμενο χρόνο επιβίωσης, με μικρότερη ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία και μεγαλύτερη πιθανότητα για πρώιμες μεταστάσεις, έτσι ώστε οι συγκεκριμένοι ασθενείς να είναι εκ των προτέρων υποψήφιοι για συμπληρωματική συστηματική θεραπεία και πιθανώς για στοχευμένη θεραπεία³⁴.

Οι Έλληνες ασθενείς με αδιαφοροποίητο (WHO-3) τύπο καρκινώματος του ρινοφάρυγγα έχουν καλύτερη πενταετή και δεκαετή επιβίωση από τους ασθενείς με καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο (WHO-1) και διαφοροποιημένο-μη κερατινοποιούμενο (WHO-2) τύπο. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης, όπου τα δείγματα βιοψιών των αδιαφοροποίητων καρκινωμάτων ήταν όλα θετικά για χρώση c-erbB2, αλλά με μέτρια ένταση (+1) έναντι της έντονης χρώσης (+2) των άλλων ιστολογικών τύπων, προτείνουμε ότι οι ασθενείς με WHO-3 έχουν καλύτερη πρόγνωση, όχι μόνο γιατί είναι πιο ευαίσθητοι στην ακτινοθεραπεία, αλλά και γιατί το ογκογονίδιο c-erbB2 εκφράζεται λιγότερο.

Σε ότι αφορά τη χρώση του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 στην παρούσα μελέτη των 42 Ελλήνων ασθενών και επί των τριών ιστολογικών τύπων του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα βρέθηκε να υπάρχει αυξημένη ανίχνευση του αντιγόνου Ki67 ως 10% στους δύο καλά διαφοροποιημένους τύπους της νόσου, έναντι χαμηλής ανίχνευσης, ως 5% στον αδιαφοροποίητο τύπο. Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι Έλληνες ασθενείς με αδιαφοροποίητο τύπο έχουν σαφώς καλύτερη πρόγνωση (49% δεκαετή επιβίωση) από τους ασθενείς με διαφοροποιημένο τύπο της νόσου (31% δεκαετή επιβίωση), μπορούμε να συσχετίσουμε την έντονη δραστηριότητα του αντιγόνου Ki67 με χειρότερη πρόγνωση της νόσου. Οι Zhieng και συν. σε μια μελέτη επί 20 Κινέζων και 3 Σουηδών ασθενών με καρκινώματα του ρινοφάρυγγα συσχέτισαν την αυξημένη έκφραση

του Ki67 με κακή πρόγνωση και προτείνουν τον προσδιορισμό του Ki67 ως προγνωστικού κριτηρίου, όπως ισχύει ήδη για λεμφοϋπερπλαστικές νόσους, για καρκίνους του μαστού και νεοπλασμάτα του συνδετικού ιστού³⁵. Κατά τους Brown και Gatter όμως υπάρχουν αρκετά πρακτικά προβλήματα τα οποία περιορίζουν τη χρήση και την αποτελεσματικότητα του Ki67 ως προγνωστικού δείκτη, ιδίως σε μικρές βιοψίες, όπως αυτές του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα, τα οποία αφορούν κυρίως στην ετερογένεια των νεοπλασματικών κυττάρων³⁶.

Το συμπέρασμα ότι το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα δεν σχετίζεται με το κάπνισμα, όπως αναφέρεται και στη διεθνή βιβλιογραφία, μας κάνει να σκεπτόμαστε ότι πρόκειται μάλλον για μια γενετική, παρά επαγγελματική ή περιβαλλοντική ασθένεια, η οποία όμως πιθανώς εμπλέκει λοίμωξη από τον EBV^{1,17,37}. Αυτό ενισχύεται ακόμη περισσότερο και από το γεγονός ότι οι ασθενείς με μη κερατινοποιημένους τύπους (WHO-2 και WHO-3) του καρκινώματος εμφανίζουν συχνότερα αυξημένα επίπεδα αντισωμάτων κατά του EBV στον ορό (90%) σε σχέση με ασθενείς με καρκινώματα τύπου WHO-1 (30%)^{17,38-41}. Εξάλλου, το καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα εμφανίζει θετικά αντισώματα anti-EA και anti-VCA κατά του ιού EBV σε ποσοστό μέχρι 73% συγκριτικά με τους άλλους καρκίνους της κεφαλής και τραχήλου, που εμφανίζουν θετικά αυτά τα αντισώματα σε ποσοστό 14-31%³⁸⁻⁴¹.

Τέλος, ο βιολογικός και ανοσοϊστοχημικός χαρακτήρας του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα είναι δύσκολο να εκτιμηθεί, όχι μόνο γιατί είναι ένας σπάνιος όγκος στην Ελλάδα, αλλά και γιατί η τοπογραφική και ανατομική του εντόπιση, κατά κανόνα, δεν επιτρέπει τη ριζική χειρουργική του εξαίρεση με σκοπό την καλύτερη μελέτη του. Το υλικό των "τυφλών" βιοψιών είναι αρκετές φορές ανεπαρκές, νεκρωτικό ή με συνθλιπτικές κακώσεις. Λόγω της μικρής ποσότητας του υλικού δεν είναι πάντα δυνατό να γίνουν πολλές τομές για ανοσοϊστοχημικό έλεγχο, ούτως ώστε να συσχετισθούν στατιστικά μεταξύ τους διάφοροι ανεξάρτητοι παράγοντες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lo K-W, Huang DP. Genetic and epigenetic

- changes in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biology* 12:451-62, 2002.
2. Jeannel D, Bouvier G, Huber A. Nasopharyngeal carcinoma: an epidemiological approach to carcinogenesis. *Cancer Surv* 33:125-155, 1999.
 3. McDermott AL, Dutt SN, Watkinson JC. The aetiology of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Otolaryngol* 26:82-92, 2001.
 4. Lo KW, Huang DWSP, Lee J. Genetic changes in nasopharyngeal carcinoma. *Chin Med J* 110:548-59, 1997.
 5. Marks JE, Philips JL, Menck HR. The National Cancer Data Base report on the relationship of race and national origin to the history of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 83:582-8, 1998.
 6. Histological typing of tumors of the upper respiratory tract and ear. WHO-2nd edition, Springer-Verlag, New York, USA, 1996.
 7. Mendenhall W, Million R, Mancuso A, Stringer S. Nasopharynx. In: Million RR, Cassisi NJ (eds) Management of head and neck cancer - a multidisciplinary approach. JB Lippincott Co, Philadelphia, 1994:599-626.
 8. Shanmugaratnam K, Sobin LH. The World Health Organization histological classification of tumors of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition. *Cancer* 71(8):2689-97, 1993.
 9. Yung WC, Sham JS, Choy DT, Ng MH. Ras p21 mutations are uncommon in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 31B(6):399-400, 1995.
 10. Sarathan D, Chang SE, Bhoite LT, Panchal RG, Kerr IB, Meht AR et al. High frequency mutation in codons 12 and 61 of H-ras oncogene in chewing tobacco-related oral carcinoma in India. *Br J Cancer* 63:573-78, 1991.
 11. Spandidos DA, Lamothe A, Field JK. Multiple transcriptional activations of cellular oncogenes in human head and neck solid tumours. *Anticancer Res* 5:221-4, 1985.
 12. Azuma M, Furumoto N, Kawamata H, Sato M. The relation of ras p21 oncogene product p21 expression to clinicopathological status and clinical outcome in squamous cell head and neck cancer. *Cancer J* 1:375-80, 1987.
 13. Tsuji T, Sakaki K, Hiraoka F, Shinozaki F. The immunohistochemical detection of ras p21 and its correlation with differentiation in oral cancers. *J Tumor Marker Oncol* 4:415-19, 1989.
 14. Field JK, Yiagnosis M, Spandidos DA, Gosney JR, Papadimitriou K, Vaugan ED et al. Low levels of ras p21 oncogene expression correlates with clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 18:168-176, 1992.
 15. Porter MJ, Field JK, Leung SF, Lo D, Lee JC, Spandidos DA, van Hasselt CA. The detection of c-myc and ras oncogenes in nasopharyngeal carcinoma by immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol* 114:105-9, 1994.
 16. Porter MJ, Field JK, Lee JCK, Leung SF, Lo D, van Hasselt CA. Detection of the tumour suppressor gene p53 in nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong Chinese. *Anticancer Res* 14:1357-60, 1994.
 17. Shi W, Pataki I, MacMillan C, Pintilie M, Payne D, O'Sullivan B et al. Molecular pathology parameters in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 94(7):1997-2006, 2002.
 18. Huang JK, Lin CT. Co-localisation of endogenous and exogenous p53 proteins in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Histochem Cytochem* 45(7):991-1003, 1997.
 19. Sheu LF, Chen A, Meng CL, Ho KC, Lin FG, Lee WH. Analysis of bcl-2 expression in normal, inflamed dysplastic nasopharyngeal epithelia and nasopharyngeal carcinoma: association with p53 expression. *Hum Pathol* 28(5):556-62, 1997.
 20. Chakrani F, Armand JP, Lenoir G, Lu LY, Liang JP, May P. Mutations clustered in exon 5 of the p53 gene in primary nasopharyngeal carcinomas from Southeastern Asia. *Int J Cancer* 61(3):316-20, 1995.
 21. Sheu LF, Chen A, Tseng HH, Leu FJ, Lin JK, Ho KC, Meng CL. Assessment of p53 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Hum Pathol* 26(4):380-6, 1995.
 22. Sheu LF, Chen A, Tseng HH, Leu FJ, Lin JK, Meng CL. Expression of p53 protein in nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* 72(3):294-6, 1994.
 23. Spruck CH, Tsai YC, Huang DP, Yang AS, Rideout WM, Gonzalez-Zulueta AM et al. Absence of p53 gene mutations in primary nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Res* 52(17):4787-90, 1992.
 24. Effert P, McCoy R, Abdel-Hamid M, Flynn K, Zhang Q, Busson P et al. Alterations of the p53 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 66(6):3768-75, 1992.
 25. Lo K, Mock C, Huang DP, Liu Y, Chio PHK, Lee JCK et al. p53 mutation in human nasopharyngeal carcinomas. *Anticancer Res* 12:1957-64, 1992.
 26. Sun Y, Hegamyer GH, Cheng YJ, Hildestheim A, Chen JCK, Chen I-H et al. An infrequent point mutation of the p53 gene in human nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 89:6516-20, 1992.
 27. Kouvidou C, Stefanaki K, Day Y, Tzardi M, Koutsoubi K, Darivianaki K et al. p21/waf1 protein expression in nasopharyngeal carcinoma. Comparative study with PCNA, p53 and

- MDM-2 protein expression. *Anticancer Res* 17:2615-20, 1997.
28. Ioachim E, Kamina S, Athanassiadou S, Agnantis NJ. The prognostic significance of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), c-erbB2, Ki67 and PCNA expression in Breast Cancer. *Anticancer Res* 16:3141-48, 1996.
 29. Oka K, Nakano T, Arai T. C-erb-B2 oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer* 73:668-71, 1994.
 30. Harpole DH Jr, Herndon JE, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology and oncoprotein expression. *Cancer Res*, 55:51-6, 1995.
 31. Lee EY, Cibull ML, Strodel WE, Haley JV. Expression of HER-2/new overexpression and epidermal growth factor receptor and prognosis in gastric carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 118:235-39, 1994.
 32. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE et al. Studies of the HER-2/new proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-12, 1989.
 33. Press MF, Pike MI, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J et al. Amplification and overexpression of HER-2/new in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res* 54:5675- 82, 1994.
 34. Roychowdhury DF, Tseng A Jr, Fu KK, Weinberg V, Weidner N. New prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma. Tumor angiogenesis and c-erb-B2 expression. *Cancer* 77(8):1419-26, 1996.
 35. Zheng X, Hu L, Chen F, Chistensson B. Expression of Ki67 antigen, epidermal growth factor receptor and Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein (LMP-1) in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 30B(5):290-5, 1994.
 36. Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein:the immaculate deception? *Histopathol* 40:2-11, 2002.
 37. Choi PH, Chen MW, Huang DP, Lo KW, Lee JC. Nasopharyngeal carcinoma: genetic changes, Epstein-Barr virus infection, or both. A clinical and molecular study of 36 patients. *Cancer* 72:2873-78, 1993.
 38. Pathmanathan R, Prasad U, Sadler R, Flynn K, Raab-Traub N. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in pre-invasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* 333:693-8, 1995.
 39. Niedobitek G, Agathangelou A, Barber P, Smallman LA, Jones EL, Young LS. P53 overexpression and Epstein-Barr virus infection in undifferentiated and squamous cell nasopharyngeal carcinomas. *J Pathol* 170:457-61, 1993.
 40. Kottaridis SD, Goula I, Vissarakis C, Agnanti N, Katsenis T. EBV- serology in NPC patients in Greece. In: E Grundman et al (eds) *Nasopharyngeal Carcinoma*. Gustav Fisher Verlag, Cancer Campaign, 5, 1981:91-93.
 41. Gulley ML, Burton MP, Allred DC, Nicholls JM, Amin MB, Ro JY et al. Epstein-Barr virus infection is associated with p53 accumulation in nasopharyngeal carcinoma. *Human Pathol* 29:252-59, 1998.

Corresponding author:

Professor N.J. Agnantis, MD, PhD, FRCPath, Department of Pathology, University of Ioannina Medical School, University Campus, P.O. Box 1186, 451 10, Ioannina, Greece, Tel: +30-26510-97792, Fax: +30-26510-97858, e-mail: nagnanti@cc.uoi.gr

Υπεύθυνος αλληλογραφίας:

Νίκη Ι. Αγνάντη, MD, PhD, FRCPath, Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τ.Θ. 1186, 451 10, Ιωάννινα. Τηλ: 26510-97792, Fax: 26510-97858, e-mail:nagnanti@cc.uoi.gr