

## Μελέτη της προγνωστικής αξίας των p53, bcl-2 και Ki67 στα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα

Μαούνη Ν.<sup>1</sup>, Χόρτη Μ.<sup>1</sup>, Μπλάνα Αικ.<sup>1</sup>, Τράκας Ν.<sup>1</sup>, Αγγελίδου Μ.<sup>1</sup>, Αποστολίκας Ν.<sup>2</sup> και Λεγάκη Σ.<sup>1</sup>

---

### Prognostic significance of p53, bcl-2 and Ki67 in non-small-cell lung carcinoma

Maounis N.<sup>1</sup>, Horti M.<sup>1</sup>, Trakas N.<sup>1</sup>, Blana Aik., Aggelidou M.<sup>1</sup>, Apostolikas N.<sup>2</sup>, Legaki S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sismanoglion General Hospital, <sup>2</sup> Saint Savas Hospital, Athens, Greece

The prognosis of patients with operable non-small cell lung cancer (NSCLC) remains poor despite thorough pre-operative staging. An improved preselection of patients likely to benefit from surgery and post surgery chemotherapy and/or radiotherapy is needed. This study was undertaken in order to evaluate the prognostic significance of Ki-67 labeling index and p53 and bcl-2 protein expression. Immunohistochemical staining for p53, bcl-2 and Ki-67 was performed on paraffin sections from 84 NSCLC, from patients who had complete and potentially curative surgery. Our results were related to various clinical and pathological parameters (patient's age, sex, disease stage and tumor type, size and differentiation). The median follow-up time of surviving patients was 23.86 months. In our study, the only statistically significant parameter for survival was stage ( $p=0.000$ ), whereas Ki-67 and p53 revealed a borderline significance ( $p=0.09$  and  $p=0.08$ ). When a multivariate analysis was performed, stage was an independent prognostic factor with 10% relative risk after Cox proportional – hazard step – wise elimination. Furthermore, in univariate analysis, statistically significant correlation was demonstrated with the 51–60 age group, poor differentiation and Ki-67 positivity ( $p<0.0109$ ,  $p<0.0547$ ). Finally, a statistically significant correlation was revealed between the adenocarcinoma group and Ki-67 and p53 positivity ( $p<0.0111$  and  $p<0.0433$  respectively). In conclusion, in our study bcl-2 expression has no prognostic value for patients with resected NSCLC, whereas Ki-67 and p53 overexpression may help to predict the outcome for patients with lung adenocarcinoma.

**Key Words:** Ki67, p53, bcl-2, non-small-cell lung cancer, immunohistochemical staining.

**ΣΚΟΠΟΣ:** Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της προγνωστικής αξίας του δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων *Ki 67* και της έκφρασης των πρωτεϊνών *p53* και *bcl-2* στα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα (ΜΜΚΠ).

**ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ:** Το αρχειακό υλικό μας αφορά 84 περιπτώσεις ασθενών που χειρουργήθηκαν για ΜΜΚΠ (76 άνδρες, 8 γυναίκες). Η ανοσοϊστοχημική χρώση έγινε με τη μέθοδο Αβιδίνης – Στρεπταβίνης και τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα αποτελέσματα συσχετίσθηκαν με κλινικο-παθολογοανατομικές παραμέτρους (ηλικία, φύλο, μέγεθος και διαφοροποίηση όγκου, στάδιο νόσου). Η μέση διάρκεια παρακολούθησης των ασθενών ήταν 23 μήνες.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Ανάλυση επιβίωσης και πολυπαραγοντική ανάλυση των αποτελεσμάτων, ανέδειξε το στάδιο της νόσου σαν τον μόνο παράγοντα που είχε στατιστικά σημαντική σχέση με την επιβίωση. Στα αδενοκαρκινώματα, παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην επιβίωση και στη θετική έκφραση του *p53* ( $p < 0,011$ ) και του *Ki67* ( $p < 0,043$ ).

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Στην παρούσα μελέτη η μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης *bcl-2* δεν είχε προγνωστική σημασία για τα ΜΜΚΠ. Χρήσιμη κρίνεται η περαιτέρω μελέτη της ομάδας των αδενοκαρκινωμάτων όπου η έκφραση τόσο της *p53* όσο και του *Ki67* σχετίζεται με την επιβίωση. Αν τα αποτελέσματα μας επιβεβαιωθούν τότε ίσως οι ανωτέρω δείκτες βοηθήσουν στην καλύτερη εκτίμηση της βιολογικής συμπεριφοράς των όγκων, στη σωστή επιλογή του θεραπευτικού πρωτοκόλλου και κατ'επέκταση στην καλύτερη εκτίμηση της πρόγνωσης της νόσου.

**Λέξεις- κλειδιά:** *p53*, *bcl-2*, *Ki67*, μη μικροκυτταρικά καρκινώματα πνεύμονα, ανοσοϊστοχημεία.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα παραμένει η κυριότερη αιτία θανάτου από νεοπλασία παγκοσμίως. Το 2002 το 31% των θανάτων από καρκίνο στους άνδρες και αντίστοιχα το 25% των θανάτων από καρκίνο στις γυναίκες αποδίδονται στον καρκίνο του πνεύμονα<sup>1</sup>. Ειδικότερα στις δυτικές βιομηχανικές χώρες υπολογίζεται ότι προσβάλλει 60 ανά 100.000 κατοίκους ετησίως<sup>2</sup>. Ο πιο αξιόπιστος και κοινά αποδεκτός προγνωστικός παράγοντας για τα καρκινώματα του πνεύμονα παραμένει το στάδιο της νόσου. Η 5ετής επιβίωση ασθενών μετά από πλήρη χειρουργική εξαίρεση κυμαίνεται από 61% στο στάδιο ΙΑ ως 24% στο στάδιο ΙΒ<sup>3</sup>. Ενδιαφέρον είναι ότι ασθενείς του ίδιου σταδίου εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στην επιβίωσή τους. Έτσι, παρότι στα αρχικά στάδια της νόσου με τη χειρουργική εξαίρεση επιτυγχάνεται μακροχρόνια επιβίωση, ένα σημαντικό ποσοστό από αυτούς τους ασθενείς θα υποστεί τοπικές υποτροπές ή και μεταστάσεις<sup>4</sup>. Επομένως, η εφαρμογή συμπληρωματικών θεραπειών είναι απαραίτητη για να επιτευχθεί βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών

αυτών. Το γεγονός αυτό καθιστά αναγκαία την αναζήτηση αξιόπιστων προγνωστικών παραγόντων βάσει των οποίων θα επιλεγούν οι ασθενείς που θα ωφεληθούν από την εφαρμογή της συμπληρωματικής χημειοθεραπείας ή και ακτινοθεραπείας.

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει περιγραφεί ένας μεγάλος αριθμός βιολογικών προγνωστικών παραγόντων, όπως δείκτες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο και την απόπτωση. Κυρίαρχο ρόλο στην καρκινογένεση παίζει η τροποποίηση της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου που σχετίζεται με το ρυθμό πολλαπλασιασμού του νεοπλάσματος. Το *Ki67* είναι ένα πυρηνικό αντιγόνο που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, εκτός από την  $G_0^5$ . Η προγνωστική αξία του δείκτη *Ki67* στα ΜΜΚΠ δεν έχει τεκμηριωθεί πλήρως. Σε μία σειρά από μελέτες έχει βρεθεί ότι υψηλή έκφραση του *Ki67* σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση, άλλες μελέτες όμως δεν είχαν τα ίδια αποτελέσματα<sup>6-13</sup>.

Η απόπτωση παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Το *p53* είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που βρίσκεται στο χρω-

μόσωμα 17p και κωδικοποιεί πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στη μεταγραφή και στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA. Η πρωτεΐνη p53 αναγνωρίζεται σαν ένας σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που έχουν υποστεί βλάβες στο DNA τους. Αναστρέψιμη παύση στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου επιτρέπει την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA πριν τη σύνδεση του. Αν οι βλάβες δεν επιδέχονται διόρθωση, τότε η πρωτεΐνη p53 οδηγεί το κύτταρο σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση)<sup>14,15</sup>. Απώλεια της λειτουργίας του p53 συμβαίνει μετά από μετάλλαξη του ενός αλληλόμορφου και την απώλεια του άλλου γονιδίου. Ακόμα και όταν παραμένει ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο γονίδιο, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη απενεργοποιεί μέσω ολιγομερισμού τη “φυσικού τύπου” p53 πρωτεΐνη. Ανώμαλη έκφραση του p53 οδηγεί σε άθροιση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών, που μπορούν να ανιχνευθούν ανοσοϊστοχημικά εξ αιτίας του διαφορετικού χρόνου ημισείας ζωής μεταξύ της φυσιολογικής και μεταλλαγμένης πρωτεΐνης (6-20 λεπτά και 6 ώρες αντίστοιχα)<sup>16</sup>.

Το πρωτοογκογονίδιο *bcl-2* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 18q21 και κωδικοποιεί μία 26KDA πρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται κυρίως στις μεμβράνες των μιτοχονδρίων. Αποστολή της είναι να εμποδίζει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο χωρίς να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καταστέλλοντας την απόπτωση και επακόλουθα ενισχύοντας την κυτταρική επιβίωση<sup>17,18</sup>. Υπερέκφραση της ογκοπρωτεΐνης *bcl-2* αποτρέπει την απόπτωση μετά από ιονίζουσα ακτινοβολία ή χημειοθεραπευτικά φάρμακα<sup>19,20</sup>. Πιστεύεται ότι η λειτουργία της *bcl-2* είναι σημαντική στα αρχικά στάδια της ογκογένεσης και ότι η απώλεια της έκφρασής της μάλλον συμβαίνει αργά στη διαδικασία της καρκινογένεσης<sup>21,22</sup>.

Μετάλλαξη του p53 και ανώμαλη έκφραση του *bcl-2* έχουν βρεθεί σε μία σειρά από νεοπλασμάτα, όπως του μαστού, του γαστρεντερικού, του πνεύμονα κ.λπ.

Στη διεθνή βιβλιογραφία είναι αλληλοσυγκρουόμενα τα αποτελέσματα όσον αφορά την προγνωστική αξία του *bcl-2* και του p53 ογκογονιδίου στα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα<sup>6,13,23-27</sup>.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση του δείκτη πολλα-

πλασιασμού Ki67 και των πρωτεϊνών p53 και *bcl-2* σε 84 μη μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) και συσχετίσαμε τα αποτελέσματα μας με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους, καθώς και με την επιβίωση των ασθενών.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η μελέτη περιλαμβάνει 84 ασθενείς, 8 γυναίκες και 76 άνδρες, μέσης ηλικίας 62.8 ετών, με ΜΜΚΠ, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση, λοβεκτομή ή πνευμονεκτομή. Κανένας από τους ασθενείς δεν έλαβε προεγχειρητική χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Η ιστολογική ταξινόμηση των καρκινωμάτων έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια της παγκόσμιας οργάνωσης υγείας (WHO) και η κλινική σταδιοποίηση των αρρώστων έγινε σύμφωνα με την TNM ταξινόμηση<sup>3,28</sup>. Συνοπτικά τα κλινικά και ιστολογικά δεδομένα της μελέτης αναφέρονται στον Πίνακα 1 (πλήρη στοιχεία υπήρχαν γιά 63 από τα μελετηθέντα περιστατικά). Η μέση παρακολούθηση των ασθενών ήταν 23 μήνες.

### Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος εφαρμόσθηκε σε τομές παραφίνης από τον όγκο, πάχους 5μm με τη μέθοδο αβιδίνης-βιοτίνης-υπερο-

**Πίνακας 1.** Κλινικοπαθολογοανατομικές παράμετροι

Παράμετρος	Συχνότητα	%
Φύλο		
Ανδρες	76	90,47
Γυναίκες	8	9,52
Μέγεθος όγκου (εκ)		
<3	12	19,0
3-7	40	63,5
>7	11	17,5
Στάδιο νόσου		
I 43	51,2	
II	16	19,0
IIIΑ	25	29,8
Διαφοροποίηση όγκου		
Καλή	11	17,2
Μέτρια	25	39,1
Χαμηλή	28	43,8
Ιστολογικός τύπος		
Αδενοκαρκίνωμα	43	51,2
Πλακώδες	40	47,6
Αδενοπλακώδες	1	1,2

ξειδάσης (ABC), χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα της DAKO Cytomation (p53: monoclonal mouse antihuman antibody, clone PA6240, Ki67: monoclonal mouse antihuman antibody, clone MIB-1, bcl-2: monoclonal mouse antihuman antibody, clone 124) και το kit "ultravision large volume detection system anti-polyvalent, HRP" της LAB VISION. Το πρωτόκολλο χρώσεως περιελάμβανε τα παρακάτω βήματα: αποπαραφίνωση και ενυδάτωση των τομών, εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση των τομών σε  $H_2O_2$  για 10 λεπτά, επώαση με πρωτεολυτικό ένζυμο, εφαρμογή του ultra-V-block για 5 λεπτά ώστε να αποφευχθεί η μη-ειδική χρώση του στρώματος, επώαση του πρωτογενούς αντισώματος για 20 λεπτά, επώαση με biotinylated goat anti-polyvalent για 10 λεπτά, επώαση με biotin-streptavidin-peroxidase για 10 λεπτά, εφαρμογή του χρωμογόνου DAB για 10 λεπτά και αντίχρωση των τομών με αιματοξυλίνη Mayer's. Παράλειψη του πρωτογενούς αντισώματος χρησιμοποιήθηκε σαν αρνητικός μάρτυρας.

Η αξιολόγηση όλων των περιστατικών έγινε "τυφλά" από δύο ανεξάρτητους παθολογοανατόμους οι οποίοι δεν γνώριζαν τα κλινικά ή ιστολογικά δεδομένα των ασθενών.

Για το p53 και το bcl-2, σε κάθε τομή εξετάσθηκαν τουλάχιστον 10 οπτικά πεδία (X400) και μετρήθηκε η μέση ποσοστιαία αναλογία θετικών p53 και bcl-2 καρκινικών κυττάρων. Το p53 εκτιμήθηκε ως θετικό όταν τουλάχιστον 10% των καρκινικών κυττάρων προσέλαβε πυρηνική χρωστική. Το bcl-2 εκτιμήθηκε ως θετικό αν η κυτταροπλασματική χρωστική ήταν εμφανής σε περισσότερο από το 10% των νεοπλασματικών κυττάρων. Για το Ki67 εξετάσθηκαν 10–20 οπτικά πεδία και μετρήθηκαν τουλάχιστον 1000 κύτταρα. Όλοι οι πυρήνες που είχαν προσλάβει τη χρωστική θεωρήθηκαν ως θετικοί ανεξάρτητα από την ένταση της χρώσης. Περιστατικά με λιγότερα από 20% θετικά κύτταρα θεωρήθηκε ότι είχαν χαμηλό δείκτη πολλαπλασιασμού, ενώ περιστατικά με περισσότερο από 20% θετικά κύτταρα θεωρήθηκε ότι παρουσίασαν υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού.

### Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 8,0. Η περιγραφική στατιστική των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων (ηλικία, φύλο, μέγε-

δος, ιστολογικός τύπος και διαφοροποίηση όγκου, στάδιο νόσου,) έγινε με τον έλεγχο των μέσων τιμών (Independent-Samples T-test) και τον έλεγχο ανεξαρτησίας του  $\chi^2$ . Η ανάλυση των κατανομών επιβίωσης έγινε μέσω της δοκιμασίας Kaplan-Meier και η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών με το Log-rank test. Για την πολυπαραγοντική ανάλυση των προγνωστικών δεικτών χρησιμοποιήθηκε το Cox's proportional hazard regression model.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αναλυτικά αποτελέσματα της μελέτης μας και η στατιστική τους ανάλυση παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Από τις 64 περιπτώσεις που μελετήθηκαν για την έκφραση του p53 οι 27 ήταν θετικές (42,2%). Η πρωτεΐνη bcl-2 εκφράσθηκε σε 34 από τα 64 καρκινώματα (53,1%), ενώ ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki67 ήταν θετικός σε 35 από τα 84 νεοπλάσματα που εξετάσθηκαν (41,7%). Η p53 πρωτεΐνη (Εικ. 1) και ο δείκτης πολλαπλασιασμού Ki67 (Εικ. 2) εμφάνισαν πυρηνική χρώση, ενώ η πρωτεΐνη bcl-2 παρουσίασε κυτταροπλασματική εντόπιση (Εικ. 3).

Η μέση παρακολούθηση των ασθενών ήταν 23,8 μήνες. Στην ανάλυση επιβίωσης, το στάδιο της νόσου ήταν ο μόνος παράγοντας που συσχετίσθηκε στατιστικά σημαντικά με την επιβίωση. Παρατηρήθηκε οριακή στατιστική συσχέτιση ανάμεσα στην αρνητική έκφραση του p53 (Εικ. 4), Ki67 (Εικ. 5) και την επιβίωση, ενώ το bcl-2 δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικ. 6) (Πίν. 3).

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε στην ηλικιακή ομάδα 51-60 μεταξύ χαμηλής διαφοροποίησης καρκινωμάτων και θετικής έκφρασης του Ki67 ( $p=0.0109$ ). Στα αδενοκαρκινώματα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην επιβίωση και στη θετική έκφραση του p53 ( $p < 0,011$ ) και του Ki67 ( $p < 0,043$ ) (Πίν. 4).

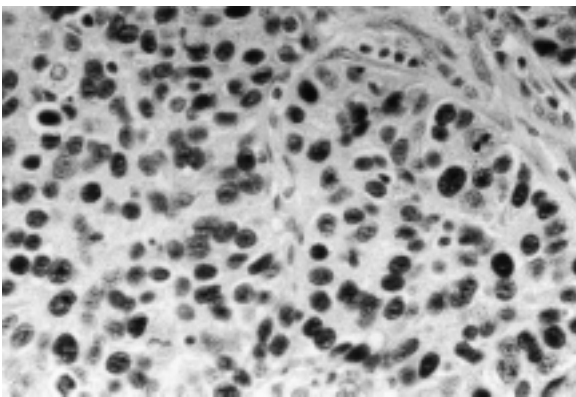
Πολυπαραγοντική ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε το στάδιο της νόσου σαν τον μόνο στατιστικά σημαντικό παράγοντα για την επιβίωση (Πίν. 5).

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

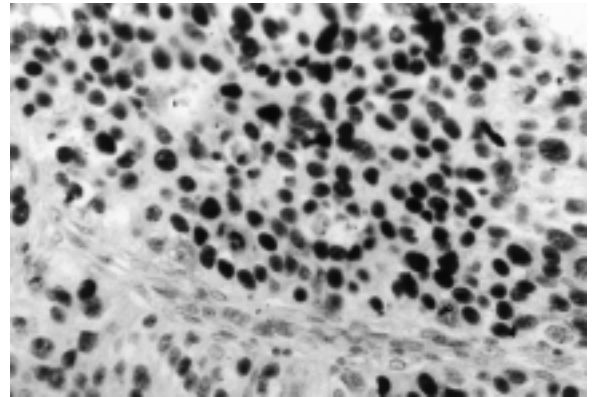
Η ραγδαία ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας έχει σαν συνέπεια την καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου και ειδικό-

**Πίνακας 2.** Συσχέτιση της έκφρασης του p53, Ki67, Bcl-2 και των κλινικο-παθολογοανατομικών παραμέτρων

Παράμετρος	p53 +	p53-	P	Ki67 +	Ki67 -	p	bcl-2 +	bcl-2 -	p
Περιστατικά	27 (42,2%)	37 (57,8%)		35 (41,7%)	49 (58,3%)		34 (53,1%)	30 (46,9%)	
Ηλικία (έτη) (mean ±SD)	61,7±9,54	63,7±17,70	NS	62,64±7,76	62,91±9,25	NS	65,15±8,02	59,8±8,47	<0,01
Φύλο									
Άνδρες	24 (41,4%)	34 (58,6%)		32 (42,1%)	44 (57,9%)		34 (58,6%)	24 (41,4%)	
Γυναίκες	3 (50,0%)	3 (50,0%)	NS	3 (37,5%)	5 (62,5%)	NS	2 (33,3%)	4 (66,6%)	NS
Μέγεθος όγκου									
<3	8 (66,7%)	4 (33,3%)		7 (58,3%)	5 (41,7%)		7 (58,3%)	5 (41,7%)	
3 έως 7	14 (35,0%)	26 (65,0%)		14 (35,0%)	26 (65,0%)		23 (57,5%)	17 (42,5%)	
>7	4 (36,4%)	7 (63,6%)	NS	5 (45,5%)	6 (54,5%)	NS	5 (45,5%)	6 (54,5%)	NS
Στάδιο									
I	12 (36,4%)	21 (63,6%)		15 (34,9%)	28 (65,1%)		17 (51,5%)	16 (48,5%)	
II	3 (27,3%)	8 (72,7%)		7 (43,8%)	9 (56,3%)		8 (72,7%)	3 (27,3%)	
IIIΑ	12 (60,0%)	8 (40,0%)	NS	13 (52,0%)	12 (48,0%)	NS	11 (55,0%)	9 (45,0%)	NS
Ιστολογικός τύπος όγκου									
ΑδενοCa	13 (40,6%)	19 (59,4%)		16 (37,2%)	27 (62,8%)		15 (46,9%)	17 (53,1%)	
Πλακώδες	14 (43,8%)	18 (56,3%)	NS	19 (47,5%)	21 (52,5%)		21 (65,6%)	11 (34,4%)	NS
Αδενοπλακώδες					1 (100%)	NS			
Διαφοροποίηση όγκου									
Καλή	5 (45,5%)	6 (54,5%)		4 (36,4%)	7 (63,6%)		5 (45,5%)	6 (54,5%)	
Μέτρια	10 (40,0%)	15 (60,0%)		10 (40,0%)	15 (60,0%)		17 (68,0%)	8 (32,0%)	
Χαμηλή	12 (42,9%)	16 (57,1%)	NS	13 (46,4%)	15 (53,6%)	NS	14 (50,0%)	14 (50,0%)	NS



**Εικόνα 1.** Ανοσοϊστοχημική πυρηνική έκφραση του p53 σε χαμηλής διαφοροποίησης πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα (ABC x100).

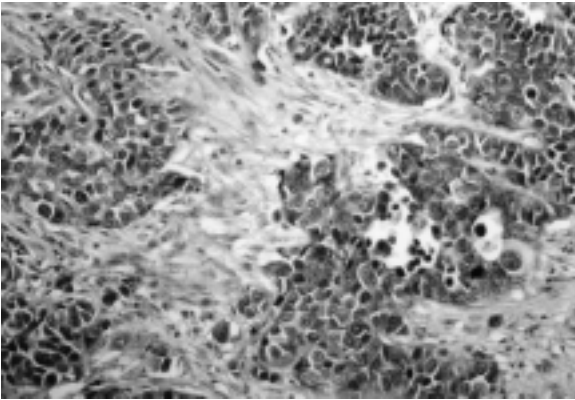


**Εικόνα 2.** Ανοσοϊστοχημική πυρηνική έκφραση του Ki67 σε χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (ABC x100).

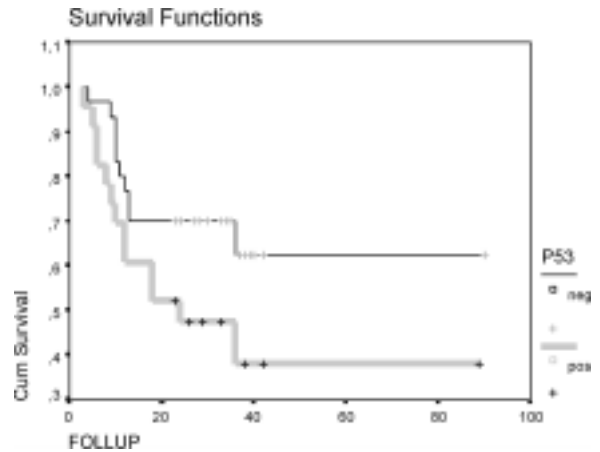
τερα του καρκίνου του πνεύμονα. Μία σειρά παραγόντων χρησιμοποιούνται σήμερα σαν προγνωστικοί δείκτες, που βοηθούν στη καλύτερη εκτίμηση των πιθανοτήτων επιβίωσης των ασθενών, με αποτέλεσμα τον καλύτερο και εξατομικευμένο σχεδιασμό της θεραπευτικής τους αντιμετώπισης.

Στα νεοπλάσματα, οι συχνότερα απαντώμενες γενετικές διαταραχές είναι οι μεταλλάξεις του p53<sup>15,29</sup>. Η συχνότητα τους στα κακοήδη

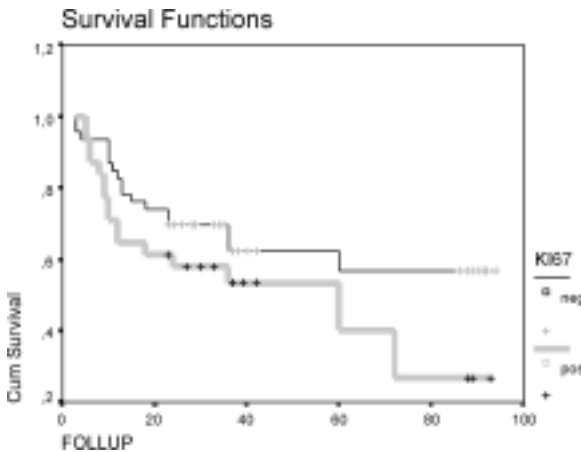
νεοπλάσματα του πνεύμονα κυμαίνεται από 44 έως 73% στα μικροκυτταρικά καρκινώματα και από 34 έως 82% στα μη μικροκυτταρικά<sup>30,31</sup>. Στην παρούσα μελέτη, η συχνότητα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του p53 ήταν 42,2%. Δεν υπάρχει ομοφωνία όσον αφορά την προγνωστική αξία του p53 στα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα. Σειρά ερευνητών παρατήρησαν ότι ασθενείς με p53-θετικούς όγκους παρουσίασαν στατιστικά σημαντική χειρότερη



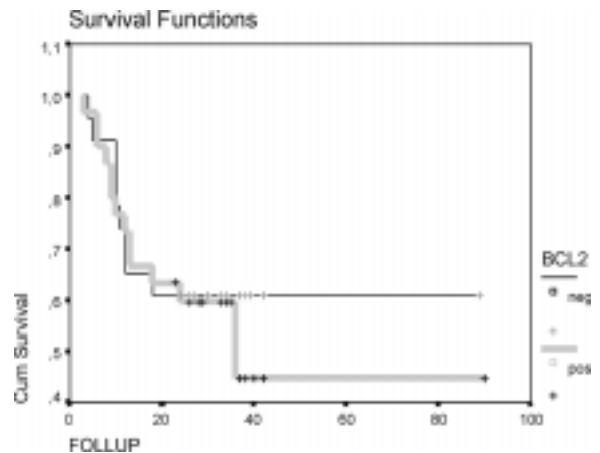
**Εικόνα 3.** Ανοσοϊστοχημική κυτταροπλασματική έκφραση του bcl-2 σε χαμηλής διαφοροποίησης πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα (ABC x100).



**Εικόνα 4.** Γραφική παράσταση κατά Kaplan-Meier της πιθανότητας επιβίωσης σύμφωνα με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του p53 ( $p=0,0833$ ).



**Εικόνα 5.** Γραφική παράσταση κατά Kaplan-Meier της πιθανότητας επιβίωσης σύμφωνα με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του Ki-67 ( $p=0,0964$ ).



**Εικόνα 6.** Γραφική παράσταση κατά Kaplan-Meier της πιθανότητας επιβίωσης σύμφωνα με την ανοσοϊστοχημική έκφραση του bcl-2 ( $p=0,6574$ ).

επιβίωση<sup>13,23,27,32-35</sup>. Άλλες όμως μελέτες δεν είχαν τα ίδια αποτελέσματα, μία που η έκφραση της πρωτεΐνης p53 δεν σχετίσθηκε με την επιβίωση<sup>6,24,26,36,37</sup>, ενώ σε μία από αυτές το p53 αναδείχθηκε θετικός προγνωστικός παράγοντας<sup>38</sup>. Στην παρούσα μελέτη, το p53 δεν αναδείχθηκε ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας. Στη μονοπαραγοντική ανάλυση των αποτελεσμάτων παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο p53 και την επιβίωση στην ομάδα των αδενοκαρκινωμάτων. Αυτό το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα και άλλων μελετών, όπου ασθενείς με αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα (αλλά όχι πλακώ-

δη καρκινώματα) θετικά στο p53 είχαν δυσμενέστερη πρόγνωση<sup>23,35</sup>.

Η ογκοπρωτεΐνη bcl-2 εκφράζεται συχνότερα στα μικροκυτταρικά σε σχέση με τα μη-μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα<sup>23</sup>. Στα ΜΜΚΠ, η συχνότητα έκφρασης του bcl-2 ποικίλει στις διάφορες μελέτες από 20-67%<sup>9,23,26,27,33</sup>. Τα πλακώδη καρκινώματα είναι συνηθέστερα θετικά στο bcl-2, σε σχέση με τα αδενοκαρκινώματα<sup>23,25-27,33,34</sup>. Στην παρούσα σειρά, 53,1% των όγκων ήταν θετικοί στο bcl-2. Η διεθνής βιβλιογραφία είναι διχασμένη όσον

**Πίνακας 3.** Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier

Μεταβλητή	Ομάδα	Μέσος χρόνος επιβίωσης	95% C.I	p
Ki 67	+	48,45	35,27-61,62	0,0964
	-	62,87	51,20-74,54	
p53	+	42,98	26,48-59,47	0,0833
	-	61,87	47,48-76,25	
Bcl-2	+	50,06	34,95-65,18	0,6574
	-	58,17	42,43-73,92	
Στάδιο	I	73,70	63,90-83,50	0,0000
	II	70,02	59,54-89,49	
	IIIΑ	19,97	9,52-30,42	
Μέγεθος όγκου (εκ.)	<3	63,56	40,06-87,12	0,4588
	3-7	55,32	41,46-69,18	
	>7	21,67	13,81-29,52	
Διαφοροποίηση όγκου	χαμηλή	55,48	40,18-70,78	0,7938
	μέτρια	27,93	20,82-35,04	
	καλή	59,56	33,83-85,29	
Ιστολογικός τύπος όγκου	Πλακώδες	45,54	34,53-56,55	0,1595
	ΑδενοCa	59,07	46,04-72,11	
	Αδενοπλακώδες	36,00	36,00-36,00	

**Πίνακας 4.** Μονοπαραγοντική ανάλυση

Παράγοντας	Μεταβλητή	Ομάδα	Μέσος χρόνος επιβ	95% C.I.	p
Αδενοκαρκίνωμα	Ki 67	+	39,50	19,92-59,08	0,0111
		-	72,83	58,20-87,45	
	p53	+	37,00	16,08-57,92	0,0433
Ηλικιακή ομάδα 51-60 ετών	Ki 67	+	37,00	7,16-66,84	0,0109
		-	Όλοι οι ασθενείς είναι εν ζωή		
Όγκοι χαμηλής διαφοροποίησης	Ki 67	+	20,27	12,60-27,95	0,0547
		-	68,00	49,76-86,24	

**Πίνακας 5.** Πολυπαραγοντική ανάλυση προγνωστικών παραγόντων κατά Cox

Προγνωστικός παράγοντας	p
Ki 67	0,0871
P53	0,1508
Bcl-2	0,6661
Στάδιο νόσου	0,0000
Ιστολογικός τύπος όγκου	0,8393
Διαφοροποίηση όγκου	0,9002

αφορά την προγνωστική αξία του bcl-2 στα ΜΜΚΠ. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το bcl-2 αναστέλλει την απόπτωση. Θεωρητικά επομένως, η υπερέκφραση του θα έπρεπε να ευνοεί την καρκινογένεση και να οδηγεί σε δυσμενέστερη πρόγνωση. Παραδόξως όμως, σε μια σειρά από μελέτες παρατηρήθηκε μεγαλύτερη επιβίωση σε ασθενείς με bcl-2-θετικούς όγκους<sup>22,25,32,39,40</sup>, γεγονός που μπορεί να οφεί-

λεται στην ιδιότητα του bcl-2 να ελέγχει την αγγειογένεση στα ΜΜΚΠ. Σε λίγες σχετικά μελέτες παρατηρήθηκε χειρότερη επιβίωση σε ασθενείς με bcl-2-θετικούς όγκους<sup>41</sup>. Τέλος σε αρκετές μελέτες, μεταξύ των οποίων και στη δικιά μας, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της επιβίωσης και της έκφρασης του bcl-2<sup>9,24,26,27,33,34</sup>.

Στην παρούσα μελέτη, ο δείκτης πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων εκτιμήθηκε με την ανοσοϊστοχημική μελέτη του Ki67. Η προγνωστική αξία του δείκτη Ki67 δεν έχει πλήρως τεκμηριωθεί. Στην ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η υψηλή έκφραση του Ki67 είναι συνυφασμένη με δυσμενέστερη πρόγνωση<sup>6,7,11-13,32</sup>. Άλλες, μεταξύ των οποίων και η δικιά μας, δεν είχαν τα ίδια αποτελέσματα<sup>8-10</sup>. Στη μονοπαραγοντική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας προκύπτει ότι στην ομάδα

των καρκινωμάτων χαμηλής διαφοροποίησης και στην ηλικιακή ομάδα 51-60 ετών παρατηρείται στατιστικώς σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο Ki67 και στην επιβίωση. Τέλος, ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι στην ομάδα των αδενοκαρκινωμάτων, ασθενείς που ήταν θετικοί στο Ki67 παρουσίασαν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς που δεν εξέφρασαν το δείκτη, παρατήρηση που συμφωνεί με τα αποτελέσματά και άλλων ερευνητών<sup>6,7,32</sup>.

Τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι συμφωνούν με αυτά άλλων ομάδων που βρήκαν ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών p53 και bcl-2 και του δείκτη πολλαπλασιασμού Ki67 δεν έχει προγνωστική σημασία για τα ΜΜΚΠ. Χρήσιμη κρίνεται η περαιτέρω μελέτη της ομάδας των αδενοκαρκινωμάτων, όπου η έκφραση τόσο της p53 όσο και του Ki67 σχετίζεται με την επιβίωση. Αν τα αποτελέσματά μας επιβεβαιωθούν, τότε ίσως οι ανωτέρω δείκτες βοηθήσουν στον καλύτερο σχεδιασμό και την εξατομίκευση της θεραπευτικής αντιμετώπισης αυτών των ασθενών.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Jemal A, Thomas A, Murray T, Samuels A, Murray T, Samuels A, Murray T, Samuels A. Cancer Statistics 2002. *CA Cancer J. Clin* 52:23-47, 2002.
- Junker K. Prognostic factors in stage I/II non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 33(Suppl. 1):17-24, 2001.
- Mountain CF. Revision in the international system for staging lung cancer. *Chest* 111(6):1710-1717, 1997.
- Martini N., Bairs MS, Burt ME, Zakowski MF, McCormack P, Rusch VW, et al. Incidence of local recurrence and secondary primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 109(1):120-129, 1995.
- Ross W and Hall PA. Ki67: from antibody to molecule understanding. *J Clin Pathol Mol Pathol* 48:113-117, 1995.
- Minami K, Saito Y, Imamura H, Okamura A. Prognostic significance of p53, Ki67, VEGF and Glut-1 in resected stage I adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 38(1):51-57, 2002.
- Shiba M, Kohno H, Kakizawa K, Iizasa T, Otsuji M, Saitoh Y et al. Ki-67 immunostaining and other prognostic factors including tobacco smoking in patients with resected non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 89(7):1457-1465, 2000.
- Mehdi SA, Ezzell JE, Newman NB, Weider N, Kohman LJ, Graziano SL. Prognostic significance of Ki-67 immunostaining and symptoms in resected stage I and II non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 20(2):99-108, 1998.
- Rigau V, Molina TJ, Chaffaud C, Huchon G, Audoin J, Chevret S et al. Blood vessels invasion in resected non small cell lung carcinomas is predictive of metastatic occurrence. *Lung Cancer* 38(2):169-176, 2002.
- Pujol JL, Simony J, Jolimoy G, Jaffuel D, Demoly P, Quantin X et al. Hypodiploidy, Ki-67 growth factor and prognosis of surgically resected lung cancers. *Br J Cancer* 74(6):964-970, 1996.
- Pence JC, Kerns BJ, Dodge RK, Iglehart JD. Prognostic significance of the proliferation index in surgically resected non-small cell lung cancer. *Arch Surg* 128(12):1382-1390, 1993.
- Scagliotti GV, Micela M, Gubetta L, Leonardo E, Cappia S, Borasio P et al. Prognostic significance of Ki67 labelling in resected non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 29A(3):363-365, 1993.
- Harpole DH Jr, Herndon JE II, 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(1):51-56, 1995.
- Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 14(1):3-15, 1995.
- Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54(18):4855-4878, 1994.
- Gannon JV, Graves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 9:1595-1602, 1990.
- Hockenberry D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334-336, 1990.
- Geske FJ, Gerschenson LE. The biology of apoptosis. *Hum Pathol* 32:1029-1038, 2001.
- Nunez G, London L, Hockenberry D. Deregulated bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived haemopoietic cell lines. *J Immunol* 144(9):3602-3610, 1990.
- Miyashita T and Reed JC. Bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEH17.2 lymphoid cells to cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic regimens. *Cancer Res* 52(1):5407-5411, 1992.

21. Walker C, Robertson L, Myskow M, Dixon G. Expression of the Bcl-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 72(1):164-169, 1995.
22. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, O'Byrne KJ, Whitehouse RM, Talbot DC, Gatter KC et al. Potential role of bcl-2 as a suppressor of tumour angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer* 74(6):565-570, 1997.
23. Grossi F, Loprevite M, Chiamondia M, Cepa P, Pera C, Ratto GB et al. Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancers. *Eur J Cancer* 39(9):1242-1250, 2003.
24. Gregorc V, Darwish S, Ludovini V, Pistola L, De Angelis V, Mihayliva Z et al. The clinical prevalence of Bcl-2, Rb and p53 expression in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 42(3):275-281, 2003.
25. Cox G, Jones JL, Andi A, Abrams KR, O'Byrne KJ. Bcl-2 is an independent prognostic factor and adds to a biological model for predicting outcome in operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 34(3):417-426, 2001.
26. Lai RS, Wang JS, Hsu HK, Chang HC, Lin CH, Lin MH. Prognostic evaluation of p53 and bcl-2 oncoproteins in patients with surgically resected non-small cell lung cancer. *Japanese J Clin Oncol* 32:393-397, 2002.
27. Laudanski J, Niklinska W, Burzykowski T, Chyczewski L, Nikliski J. Prognostic significance of p53 and bcl-2 abnormalities in operable nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 17(4):660-666, 2001.
28. Histological typing of lung tumours, Vol 1. 2<sup>nd</sup> ed. International Histological Classification of Tumours No1, World Health Organization, Geneva, 1981.
29. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. *Science* 253(5051):49-53, 1991.
30. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335(8691):675-679, 1990.
31. Takahashi T, Suzuki H, Hida T, Sekido Y, Ariyoshi Y, Ueda R. The p53 gene is very frequently mutated in small cell lung cancer with a distinct nucleotide substitution pattern. *Oncogene* 6(10):1775-1778, 1991.
32. Ishida H, Irie K, Itoh T, Furukawa T, Tokunaga O. The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki67 growth fraction. *Cancer* 80(6): 1034-1045, 1997.
33. Han H, Landreneau RJ, Santucci TS, Tung MY, Macherey RS, Shackney SE et al. Prognostic value of immunohistochemical expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in stage I non-small-cell lung cancer. *Hum Pathol* 33(1):105-110, 2002.
34. D'Amico TA, Massey M, Herndon JE, Moore MB, Harpole Jr DH. A biological risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117(4):736-743, 1999.
35. Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic significance of p53 alteration in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 6(10):4055-4063, 2000.
36. Reinmuth N, Brandl B, Kunze WP, Junker K, Thomas M, Achatzy, et al. Ploidy, expression of erbB1, erbB2, p53 and amplification of erbB1 and erbB2 in non-small cell lung carcinoma. *Eur Respir J* 16(5):991-996, 2000.
37. Cagini L, Monacelli M, Giustozzi G, Moggi L, Bellezza G, Sidoni A. Biological prognostic factors for early stage completely resected non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 74(1):53-60, 2000.
38. Lee J, Yoon A, Kalapurakal S. Expression of p53 oncoprotein in non-small cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *J Clin Oncol* 13(8):1893-1903, 1995.
39. Fontanini G, Boldrini L, Vignati S. Bcl-2 and p53 regulate vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer* 34:718-723, 1998.
40. Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C et al. Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 89:55-64, 2003.
41. Huang CI, Neuberg D, Johnson BE, Wei JY, Christiani DC. Expression of bcl-2 protein is associated with shorter survival in non small cell lung carcinoma. *Cancer* 98:135-143, 2003.

---

**Corresponding author:**

Nicoletta Maouni,  
Kavafi 8, P. Pendeli  
Athens 15236  
Tel: 210-8039912, 210-6669259  
Email: nmaounis@otenet.gr

---

**Υπεύθυνη αλληλογραφίας:**

Νικολέττα Μασούνη  
Καβάφη 8, Π. Πεντέλη,  
Αθήνα 15236  
Τηλ: 210 8039912, 2106669259  
Email: nmaounis@otenet.gr