Η προγνωστική αξία της κυκλίνης D1 και του p16 στις δεύτερες πρωτοπαθείς βλάβες του ακανθοκυτταρικού καρκίνου του στόματος

Χρήστος ΜΑΓΟΠΟΥΛΟΣ[1], Θεοδώρα ΚΑΤΟΠΩΔΗ[2], Φώτης ΙΟΡΔΑΝΙΔΗΣ[3], Γεωργία ΘΕΟΧΑΡΗ[4], Αλέξανδρος ΛΑΜΠΡΟΠΟΥΛΟΣ[5], Ιωάννης ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΣ[6]

Τμήμα Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής, Οδοντιατρική Σχολή ΑΠΘ.
Τμήμα Παθολογικής Ανατομικής, ΓΝ «Γ. Παπανικολάου».
Τμήμα Βιολογίας, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ

Prognostic value of cyclin-D1 and p16 in second primary oral squamous cell carcinoma

Christos MAGOPOULOS, Theodora KATOPODI, Fotis IORDANIDIS, Geogia THEOHARI, Alexandros LAMBROPOULOS, Ioannis DIMITRAKOPOULOS

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Aristotle University, Dental School, Thessaloniki, Greece.
Department of Pathology, 'G Papanikolaou' Hospital, Thessaloniki, Greece.
Department of General Biology and Genetics, Aristotle University, Medical School, Thessaloniki, Greece.

Ερευνητική εργασία
Research paper

ΠΕΡΙΛΗΨΗ: *Σκοπός:* Η μελέτη της προγνωστικής αξίας της πρωτεϊνικής έκφρασης της κυκλίνης D-1 και του p16 καθώς και άλλων κλινικοπαθολογικών παραγόντων στην αξιολόγηση του κλινικού και γενετικού προφίλ των ΔΠΟ. *Υλικό και μέθοδοι:* Έγινε ανοσοϊστοχημική ανάλυση ιστικών δειγμάτων παραφίνης 25 ασθενών με 80 συνολικά ΔΠΟ. *Αποτελέσματα:* Η πολυπαραγοντική ανάλυση κατέδειξε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (ΕΕΝ) με την υπερέκφραση της κυκλίνης D-1(P=.015). Η συνεργική δράση της κυκλίνης D-1 και του p16 απέτυχε να καταδείξει στατιστική συσχέτιση με την ΕΕΝ ή με την ολική επιβίωση (ΟΕ) σε όλους τους συνδυασμούς έκφρασης. Διαπιστώθηκε επίσης διαφορετικό μοντέλο έκφρασης της κυκλίνης D-1 και του p16 μεταξύ του αρχικού όγκου και του πρώτου ΔΠΟ (P<0.05). *Συμπεράσματα:* Οι ασθενείς με ΔΠΟ φαίνεται να αποτελούν μία διαφορετική νοσολογική οντότητα με ξεχωριστό κλινικοπαθολογικό και γενετικό προφίλ. Επιπλέον, η διαφορετική προγνωστική αξία της υπερέκφρασης της κυκλίνης D-1 και της απώλειας του p16 στους ασθενείς με ΔΠΟ ενισχύουν την υπόθεση αυτή.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Δεύτεροι πρωτοπαθείς όγκοι, κυκλίνη D-1, p16.

Παρελήφθη: 30/8/2011 - Έγινε δεκτή: 15/11/2011

SUMMARY: *Aim:* To examine the prognostic value of cyclin-D1, p16 protein expression and other clinicopathological parameters in the evaluation of the clinical outcome and genetic profile of SPTs. *Materials and methods:* Immunohistochemical staining was performed in paraffin embedded specimens that were obtained from 25 patients with 80 second primary Oral Squamous Cell Carcinomas (OSCC). *Results:* Multivariate analysis revealed statistically significant positive relation of disease free survival (DFS) with cyclin-D1 overexpression (P=.015). Overall survival (OS) was not correlated significantly to none of the clinical and IHC parameters investigated. Synergistic action of cyclin-D1 with p16 failed to reach statistical significant relation with either DFS or OS in all fashions of expression. Different mode of expression was identified between the index and the first SPTs concerning both cyclin-D1 and p16 (P<0.05). *Conclusions:* Patients with SPTs seem to outline a distinct entity in terms of clinicopathological behavior and genetic profile of the tumor cells. Moreover, the different prognostic value of cyclin-D1 overexpression and p16 loss of function in patients with SPTs makes our verification more potent.

KEY WORDS: Second primary tumors, cyclin-D1, p16.

Paper received: 30/8/2011 - Accepted: 15/11/2011

[1] *Επιμελητής ΣΓΠΧ 424 ΓΣΝΕ*
[2] *Βιολόγος, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ*
[3] *Επιμελητής Β, Παθολογοανατόμος Νοσοκ Γ. Παπανικολάου*
[4] *Μαθηματικός-στατιστικολόγος, ΑΠΘ*
[5] *Αναπλ. Καθηγητής, Ιατρική Σχολή ΑΠΘ*
[6] *Καθηγητής ΣΓΠΧ, ΑΠΘ*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα της στοματικής κοιλότητας αντιπροσωπεύει περίπου το 5% των καρκινωμάτων της κεφαλής και του τραχήλου και παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί τις τελευταίες δεκαετίες τόσο στη διάγνωση και στις χειρουργικές τεχνικές όσο και στην ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία, η πρόγνωση παραμένει φτωχή (Greenlee και συν. 2001). Οι δεύτεροι πρωτοπαθείς όγκοι (ΔΠΟ) έχει αναφερθεί ότι αποτελούν περίπου το 9 έως 30% όλων των καρκινωμάτων της κεφαλής και του τραχήλου και ότι επηρεάζουν σημαντικά την πρόγνωση, ιδιαίτερα σε ασθενείς με καρκίνο της στοματικής κοιλότητας (Braakhuis και συν. 2002). Πρώτος ο Slaughter και συν. το 1953 καθόρισε τον όρο δεύτεροι πρωτοπαθείς όγκοι (second primary tumors - SPTs) εισάγοντας την έννοια της καρκινογένεσης πεδίου (field cancerisation) βασιζόμενος στην παρατήρηση ότι μία ευρεία περιοχή επιθηλίου γύρω από τον αρχικό όγκο εμφάνιζε ιστολογικές μεταβολές με πιθανότητα εμφάνισης δεύτερων ανεξάρτητων εστιών ακανθοκυτταρικού καρκίνου σε ολόκληρη την ανώτερη αεροπεπτική οδό (Slaughter και συν. 1953). Οι ΔΠΟ σε ασθενείς με ακανθοκυτταρικό καρκίνο κεφαλής και τραχήλου καθορίζονται από τους περισσότερους ερευνητές με βάση τα κριτήρια των Warren and Gates ως εξής: 1. Κάθε ένας από τους όγκους να είναι κακοήθης, 2. Όλοι οι όγκοι να είναι ξεχωριστοί μεταξύ τους, 3. Κανένας όγκος να μην είναι μεταστατικός. Επίσης στις κακοήθεις βλάβες του στοματικού βλεννογόνου, η απόσταση μεταξύ τους πρέπει να είναι τουλάχιστον 2 cm ενώ ορισμένοι ερευνητές προσθέτουν ως κριτήριο το ελάχιστο χρονικό διάστημα που παρεμβάλλεται από την εμφάνιση της πρώτης μέχρι εκείνη της δεύτερης βλάβης να είναι 3 έτη (Warren και Gates, 1932, Hong και συν. 1990, Leong και συν. 1998).

Σήμερα γίνεται προσπάθεια με μοριακές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους ανάλυσης συγκεκριμένων δεικτών που ρυθμίζουν την λειτουργία του καρκινικού κυττάρου σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, να διερευνηθεί όλη η διαδικασία της καρκινογένεσης πεδίου η οποία χαρακτηρίζεται από την συσσώρευση χρωμοσωμικών μεταλλάξεων και γενετικών ανωμαλιών (Califano και συν. 1996, Pateromichelakis και συν. 2005). Το κυτταρικό μονοπάτι κυκλίνη D-1/p16/φωσφορυλιωμένο ρετινιβλάστωμα, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής αντίδρασης σε εξωκυττάρια ερεθίσματα, ενώ φαίνεται να είναι ουσιώδους σημασίας στη λειτουργία του σημείου ελέγχου G1/S του κυτταρικού κύκλου. Η ενεργοποιημένη κυκλίνη D-1 συνδέεται με τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες 4 και 6 (cdk4 and cdk6) δημιουργώντας συμπλέγματα cdk4/cyclin-D1 και cdk6/cyclin-D1, τα οποία φωσφορυλιώνουν την πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος (pRb).

INTRODUCTION

Squamous cell carcinoma of the oral cavity (OSCC) represents nearly 5% of all head and neck tumors and despite advances in diagnosis, surgical techniques, radiotherapy and chemotherapy, prognosis remains poor over the last decades (Greenlee et al. 2001). Second primary tumors (SPTs) are reported to constitute 9- 30% of all head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) and to have a significant impact on prognosis especially in patients with oral sqamous cell carcinoma (OSCC) (Braakhuis et al. 2002). Slaughter et all in 1953 first defined second primary tumors by initiating the concept of field cancerisation based on the observation that a large area of epithelium surrounding the primary tumor possessed histologic changes with the possibility of developing new independent foci of squamous cell carcinoma in the upper aerodigestive tract (Slaughter et al. 1953). In clinicopathological terms, SPTs in patients with HNSCC are defined by most investigators with the criteria of Warren and Gates (1932): 1.Each of the tumors must present a definite picture of malignancy, 2. Each must be distinct and 3. The probability of one being a metastasis of the other must be excluded. For malignancies confined in the oral cavity the distance of 2 cm should lay between the tumors whereas, a 3-year interval between first and second tumor is added by some researchers to the criteria that define a SPT (Warren and Gates, 1932, Hong et al. 1990, Leong et al. 1998).

To date, molecular and immunohistochemical analysis of specific markers that regulate cell cycle control, try to elucidate the multistep process of field cancerization, that is characterized by the accumulation of chromosome alterations and several aberrant genetic events (Califano et al. 1996, Pateromichelakis et al. 2005). The cyclin-D1/p16/phosphorylated Rb pathway plays an important role in modulating the response to extracellular stimuli and is believed to be essential G1/S checkpoint of the cell cycle. Activated cyclin-D1 binds to cyclin dependent kinase 4 and 6 (cdk4 and cdk6) to create cdk4/cyclin-D1 and cdk6/cyclin-D1 complexes that phosphorylate the Rb protein (pRb), thereby releasing E2F transcription factor family. E2F facilitates entry into and progression through the S phase, initiating the transcription of genes that regulate DNA synthesis.

In contrast, p16 protein as a cdk family inhibitor outgrowth, specifically inhibits cdk4 and cdk6 by disrupting active kinase complexes with cyclin-D1, and prevents phosphorylation of Rb and therefore passage through the G1/S checkpoint.

Mutations of the cyclin-D1/p16/Rb pathway are quite common in OSCC. Overexpression of cyclin-D1 is linked to tumor aggressiveness, decreased disease free

Από τη διαδικασία αυτή ενεργοποιούνται οι μεταγραφικοί παράγοντες E2F οι οποίοι διευκολύνουν τη μετάβαση στην S φάση του κυτταρικού κύκλου κατά την οποία γίνεται η μεταγραφή του DNA.
Η πρωτεΐνη p16 ως αναστολέας των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (cdk inhibitor), αναστέλλει τις cdk4 και cdk6 διασπώντας τα συμπλέγματα με την κυκλίνη D-1 εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση του ρετινοβλαστώματος και κατά συνέπεια τη μετάβαση από το σημείο ελέγχου G1/S του κυτταρικού κύκλου.
Μεταλλάξεις του συστήματος cyclin-D1/p16/Rb είναι ιδιαίτερα συχνές στον ακανθοκυτταρικό καρκίνο του στόματος. Υπερέκφραση της κυκλίνης D-1 έχει συνδεθεί με αυξημένη επιθετικότητα του όγκου, μειωμένη ολική επιβίωση και μειωμένη επιβίωση ελεύθερης νόσου (Namazie και συν. 2002, Miyamoto και συν. 2003, Uzawa και συν. 2007), ενώ η απώλεια της λειτουργικότητας του p16 έχει συνδεθεί με φτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του στόματος (Bova και συν. 1999). Παρά το γεγονός ότι ανωμαλίες στο συγκεκριμένο κυτταρικό μονοπάτι εμφανίζονται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% των ασθενών, η προγνωστική αξία των δύο αυτών δεικτών δεν έχει μελετηθεί σε ασθενείς με ΔΠΟ (Michailides και συν. 2002). Η πιθανότητα διαφορετικής πορείας των ΔΠΟ σε κλινικό, ιστοπαθολογικό και κυτταρικό επίπεδο καθιστά την μελέτη των δεικτών αυτών ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα.
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της προγνωστικής αξίας της κυκλίνης D1, του p16 και άλλων κλινικοπαθολογικών παραγόντων σε 25 ασθενείς με συνολικά 80 βλάβες ακανθοκυτταρικού καρκίνου της στοματικής κοιλότητας, δηλαδή σε ασθενείς με ΔΠΟ. Μελετήθηκε επίσης ο ρόλος της κυκλίνης D1 και του p16 στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου καθώς και η πιθανή κλωνικότητα των ΔΠΟ.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Μελετήθηκαν οι πρωτοπαθείς βλάβες των 25 ασθενών οι οποίοι εμφάνισαν έναν ή περισσότερους ΔΠΟ κατά το χρονικό διάστημα από το 1996 έως το 2009. Οι ΔΠΟ καθορίστηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια των Warren και Gates (1932), εμφανίστηκαν δηλαδή τουλάχιστον 3 έτη αργότερα και σε απόσταση μεγαλύτερη των 2 cm από την αρχική βλάβη. Όλοι οι ασθενείς της μελέτης ήταν σταδίου I ή II κατά την πρώτη διάγνωση και υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου ως πρώτη θεραπευτική μέθοδο. Μελετήθηκε η ηλικία των ασθενών κατά την πρώτη διάγνωση, το φύλο, η εντόπιση της πρώτης βλάβης, ο αριθμός των ΔΠΟ, καθώς και η ανοσοϊστοχημική ανάλυση της κυκλίνης D-1 και του p16 σε σχέση με την ολική επιβίωση και την επιβίωση ελεύθερης νόσου. Επίσης μελετήθηκε η συσχέτιση της υπερέκφρασης της κυκλίνης D-1 και της

survival (DFS) and overall survival (OS) (Namazie et al. 2002, Miyamoto et al. 2003, Uzawa et al. 2007), whereas loss of p16 function is correlated with poor prognosis in oral cancer patients (Bova et al. 1999). Although overall aberrations in this pathway occur in >80% of OSCC, the prognostic value of these markers hasn't been quite clear in patients with SPTs (Michailides et al. 2002). The hints of specific and distinct clinical, pathological and genetical process of second primary tumors of the oral cavity, makes the detection of these markers quite attractive.
The aim of this study is to investigate the prognostic value of cyclin- D1, p16 and other clinicopathological parameters in 25 patients with 80 second primary oral squamous cell carcinomas. The correlation of cyclin-D1 to p16 in the cell cycle control is also studied, while it is pointed out the possible clonal relation between the index and the second primary tumors in these patients.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Eighty tissue samples were analyzed, obtained from 25 patients with OSCC that presented one or more SPTs and were treated between 1993 and 2005. SPTs were defined according to the criteria of Warren and Gates (1932) and had occurred at least 3 years after diagnosis of the primary tumor with a distance of 2cm of normal mucosa lying in between. All 25 patients with SPTs were included in a cohord of 257 consecutive patients with OSCC treated during the same period in our Department. All patients included in this study received surgery as their primary therapeutic method and all had stage I or II disease (T1 or T2 N0 M0) according to the guidelines established by the American Joint Committee on Cancer Staging in 1988. Patient age at diagnosis, sex, tumor location, number of SPTs, cyclin-D1 and p16 protein immunohistochemical expression were analyzed with respect to two outcome parameters: DFS and OS. DFS was estimated from the time of initial examination to the time of the first SPT occurrence. OS was estimated from the time of initial examination to the time of death or the time of last follow-up. In addition, cyclin-D1 overexpression was correlated to p16 loss of expression. Moreover, the relation between cyclin-D1/ p16 expression status of the index tumors and the first SPTs was analysed.

IHC staining and grading of cyclin-D1 and p16

Immunoperoxidase staining was done on 4-μm cut tissue sections using the same system and following the manufacturer's instructions (DAKO LSAB2 horseradish peroxidase System, DAKO Corp, Carpinteria, CA). Monoclonal antibody against cyclin D1 (1:100, clone DCS-6, Dako Corporation, Golstrup, Denmark) and

απώλειας της έκφρασης του p16, καθώς και συσχέτιση της έκφρασης της κυκλίνης D-1 και του p16 μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και του πρώτου ΔΠΟ. Ως ολική επιβίωση (ΟΕ) καθορίστηκε το χρονικό διάστημα από την αρχική διάγνωση έως το θάνατο του ασθενούς ή την ημέρα της τελευταίας εξέτασης, ενώ ως επιβίωση ελεύθερης νόσου (ΕΕΝ) καθορίστηκε το χρονικό διάστημα από την αρχική διάγνωση έως την διάγνωση του πρώτου ΔΠΟ. Η παρακολούθηση των ασθενών κυμάνθηκε από 6 έως 264 μήνες.

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση της κυκλίνης D-1 και του p16

Διενεργήθηκε βαφή ανοσοπεροξειδάσης σε τμήματα ιστών 4μ χρησιμοποιώντας συγκεκριμένο σύστημα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (horseradish peroxidase System, DAKO Corp, Carpinteria, CA). Χρησιμοποιήθηκαν μονοκλωνικά αντισώματα της κυκλίνης D-1 (1:100, clone DCS-6, Dako Corporation, Golstrup, Denmark) και του p16 (1:40, Novacastra Labs, Ltd, United Kingdom). Για την κυκλίνη D-1 τα ιστικά τεμάχια τοποθετήθηκαν σε EDTA (pH = 8.0, 1 mM) και θερμάνθηκαν στους 95°C για 20΄. Για το p16 τα ιστικά τεμάχια τοποθετήθηκαν σε citrate buffer (pH = 6.0, 10 mM) και κατόπιν σε μικροκλίβανο 3 φορές για 5΄ η κάθε μία. Όλες οι ανοσοϊστοχημικές βαφές εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας κοινό μικροσκόπιο. Ως θετικό αποτέλεσμα μεταφράστηκε η ευδιάκριτη πυρηνική βαφή καφέ χρώματος τόσο για την κυκλίνη D-1 (Εικ. 1) όσο και για το p16. (Εικ. 2). Τα ιστικά δείγματα με περισσότερο του 5% των καρκινικών κυττάρων με θετική πυρηνική χρώση θεωρήθηκαν ως θετικά στην παρούσα μελέτη. Ως θετικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ιστικά τεμάχια mantle cell λεμφώματος τα οποία εμφάνισαν ισχυρή θετικότητα στη χρώση της κυκλίνης D-1, καθώς και ιστικά τεμάχια ακανθοκυτταρικού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας με ισχυρή θετικότητα στη χρώση του p16. Ως αρνητικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα θετικά δείγματα ελέγχου, αντικαθιστώντας τα αρχικά αντισώματα με διάλυμα buffer.

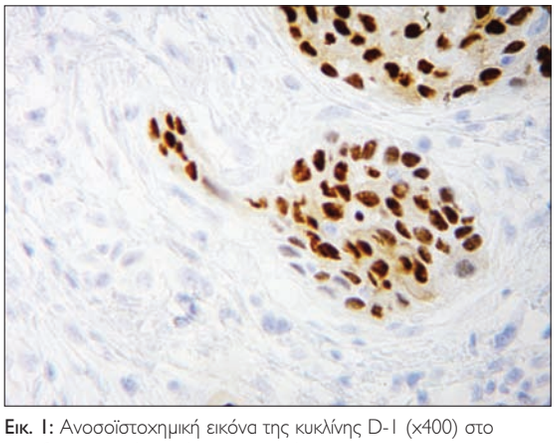
Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση της μελέτης πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS. Χρησιμοποιήθηκαν οι στατιστικές μέθοδοι x^2 test, independent samples t-test και Pearson correlation coefficient για την σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσης μελέτης. Οι καμπύλες επιβίωσης για την επιβίωση ελεύθερης νόσου και την ολική επιβίωση υπολογίστηκαν με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Επίσης, επιλέχθηκε το μοντέλο Cox regression για την αναγνώριση των μεταβλητών με τη μεγαλύτερη προγνωστική αξία. Σε όλες τις περιπτώσεις η μεταβλητή P value μικρότερη του 0,05 θεωρήθηκε σημαντική.

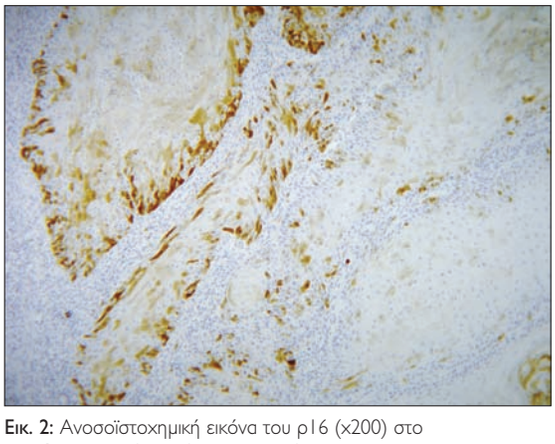
p16 (1:40, Novacastra Labs, Ltd, United Kingdom) were used. Antigen retrieval was done. For cyclin D1, the sections were placed in EDTA (pH = 8.0, 1 mM) in a steamer for 20´ at 95°C. For p16, the sections were placed in citrate buffer (pH = 6.0, 10 mM) and microwaved 3 times for 5´ each. The immunohistochemical stains were examined using a light microscope. A positive result was rendered for cells showing distinct brown staining of nucleus for p16 (Fig. 1) and for cyclin D1 (Fig. 2). Samples with more than 5% of the cells containing nuclear staining were considered positive in the present study. As positive controls, we used sections of a mantle cell lymphoma that were strongly positive for cyclin-D1 and a squamous cell carcinoma of the cervix with known positive staining for p16. As negative controls, the same sections, which were used as positive controls were used, replacing the primary antibody with buffer solution.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS statistical package. The x^2 test, independent samples t-test and the Pearson correlation coefficient were used for



Εικ. 1: Ανοσοϊστοχημική εικόνα της κυκλίνης D-1 (x400) στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος.
Fig. 1: Immunohistochemical staining for cyclin D1 (x 400) in OSCC.



Εικ. 2: Ανοσοϊστοχημική εικόνα του p16 (x200) στο ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα του στόματος.
Fig. 2: Immunohistochemical staining for p16 (x 200) in OSCC.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασης της κυκλίνης D-1 και του p16

Η κατανομή των θετικών κυττάρων βρέθηκε ετερογενής στις καρκινικές φωλεές. Δεκαπέντε ασθενείς (60%) εμφάνισαν υπερέκφραση της κυκλίνης D-1, ενώ 22 ασθενείς (88%) εμφάνισαν απώλεια της έκφρασης του p16. Επιπλέον, 14 ασθενείς (56%) βρέθηκαν να εμφανίζουν ταυτόχρονα υπερέκφραση της κυκλίνης D-1 και απώλεια της έκφρασης του p16.

Κλινικές παράμετροι

Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 56 έτη (κλιμακούμενη από 26 έως 74 έτη) κατά την πρώτη εξέταση και η αναλογία φύλου ήταν 1.5/1 γυναίκες προς άνδρες. Η θέση του πρωτοπαθούς και των ΔΠΟ φαίνονται στους Πίνακες 1 και 2, ενώ ο αριθμός των ΔΠΟ κυμάνθηκε από 2 έως 9 για τους 25 ασθενείς. Η περίοδος επανεξετάσεων των ασθενών κυμάνθηκε από 6 έως 264 μήνες (Πίνακας 3).

Συσχέτιση της ΕΕΝ και ΟΕ με ανοσοϊστοχημικές και κλινικές παραμέτρους

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της επιβίωσης ελεύθερης νόσου (ΕΕΝ) και του φύλου, της ηλικίας, του αριθμού των ΔΠΟ και της απώλειας της έκφρασης του p16. Η πολυπαραγοντική ανάλυση

the comparison of the results of our study. Survival curves for overall and disease-free survival were estimated by the Kaplan-Meier method. Cox regression model was selected in order to identify the variables with the greatest prognostic value. In all cases P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

IHC analysis of cyclin-D1 and p16 expression

Immunohistochemical staining of both cyclin-D1 and p16 was nuclear. Distribution of positive cells was heterogenous in cancer nests. Fifteen patients (60%) had cyclin-D1 overexpression in the index tumor, while 22 patients (88%) had loss of p16 expression. Moreover, 14 patients (56%) were found to have cyclin-D1 overexpression and p16 loss of expression.

Clinical outcome

The mean age of the patients was 56 years (ranging from 26 to 74 years) at the time of presentation and the sex ratio was 1.5 : 1, females to males (15 females and 10 males). The location of the index and second primary tumors are seen in Tables 1 and 2, while the number of the SPTs ranged from 2 to 9 for the 25 patients. The follow-up period ranged from 20 to 264 months (Table 3).

Πίνακας 1
Τοπογραφία και συχνότητα των αρχικών βλαβών

	Τοπογραφία	Συχνότητα	Ποσοστό %
Valid	Παρειά	6	24,0
	Ουλικός βλεννογ.	5	20,0
	Γλώσσα	7	28,0
	Έδαφος στόματος	3	12,0
	Οπισθογόμφιο τρίγωνο	4	16,0
	Σύνολο	25	100,0

Table 1
Location and frequency of the index tumors

	Location	Frequency	Percent %
Valid	Cheek	6	24,0
	Gingiva	5	20,0
	Tongue	7	28,0
	FOM	3	12,0
	RetroMT	4	16,0
	Total	25	100,0

FOM: floor of mouth, RetroMT: retromolar trigone

Πίνακας 2
Τοπογραφία και συχνότητα των ΔΠΟ

	Τοπογραφία	Συχνότητα	Ποσοστό %
Valid	Παρειά	10	18,0
	Ουλικός βλεννογ	19	35,0
	Γλώσσα	14	25,0
	Εδαφος στόματος	6	11,0
	Οπισθογόμφιο τρίγωνο	1	2,0
	Κάτω χείλος	5	9
	Σύνολο	55	100,0

Table 2
Location and frequency of the second primary tumors

	Location	Frequency	Percent %
Valid	Cheek	10	18,0
	Gingiva	19	35,0
	Tongue	14	25,0
	FOM	6	11,0
	RetroMT	1	2,0
	Lip	5	9
	Total	55	100,0

FOM: floor of mouth, RetroMT: retromolar trigone

Πίνακας 3

Κλινικές και ανοσοϊστοχημικές παράμετροι των ασθενών

No ασθενών	Φύλο	Ηλικία	EEN (μήνες)	OE (μήνες)	p16 (%)	D1 (%)
1	Γ	66	0	39 μ	2	30
					0	8
					0	20
2	Γ	49	11μ	20μ (απεβ)	0	10
					0	20
3	Α	55	3μ	35μ (απεβ)	0	5
					1	5
4	Γ	64	72μ	117μ	0	40
					0	5
5	Α	58	56μ	84μ (απεβ)	0	20
					1	4
6	Γ	61	0	33μ	0	4
					0	4
					0	5
7	Α	43	18μ	32μ	0	10
					3	3
8	Α	58	10μ	80μ (απεβ)	0	5
					0	20
9	Α	40	0	74μ (απεβ)	0	2
					4	3
10	Γ	69	8μ	84μ (απεβ)	0	5
					3	5
					0	4
					0	5
					0	5
					0	10
					0	10
					0	4
					0	1
11	Α	51	8μ	94μ	0	40
					0	8
					0	8
					0	5
12	Γ	63	10μ	52μ	4	10
					0	5
13	Α	72	12μ	55μ	5	3
					8	10
14	Γ	52	6μ	120μ (απεβ)	8	10
					1	4
					0	1
					0	1
					0	10
					0	1
					1	10
					0	10
15	Γ	46	91μ	216μ (απεβ)	0	30
					0	40
					0	10
					0	20
					-	30
					0	30
					0	30
16	Α	59	30μ	146μ	10	5
					1	4
					0	3
					2	3
17	Α	26	40μ	264μ	2	20
					0	40
18	Α	73	0	51μ	4	3
					15	10
19	Γ	36	10μ	129μ	0	10
					4	5
					0	2
20	Γ	52	11μ	130μ	0	10
					0	5
21	Γ	60	14μ	24μ (απεβ)	2	10
					0	40
					0	40
22	Γ	65	13μ	66μ	0	10
					0	10
23	Γ	50	27μ	250μ	0	5
					2	4
					0	2
24	Γ	74	18μ	36μ	0	30
					0	20
25	Γ	64	7μ	29μ	0	20
					0	20
					0	10
					0	50
					0	20

P16%: ποσοστό % των θετικών στο p16 καρκινικών κυττάρων. D1 %: ποσοστό% των θετικών στη κυκλίνη D1 καρκινικών κυττάρων. EEN: επιβίωση ελεύθερης νόσου. OE: ολική επιβίωση. Απεβ: απεβίωσε

(multivariate analysis) ανέδειξε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της EEN και της υπερέκφρασης της κυκλίνης D-1 (Cox regression model– p=0.015). Αντίθετα η ολική επιβίωση (OE) δεν συσχετίστηκε σημαντικά με καμία από τις κλινικές και ανοσοϊστοχημικές παραμέτρους που μελετήθηκαν. Επιπλέον, η συνεργική δράση της κυκλίνης D-1 και του p16, απέτυχε να εμφανίσει στατιστικά θετική συσχέτιση με την EEN και με την OE, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (ομάδα 1: υπερέκφραση κυκλίνης D-1 και απώλεια της έκφρασης του p16, ομάδα 2: αρνητική έκφραση της κυκλίνης D-

Correlation of DFS and OS to clinical and IHC parameters

Disease free survival (DFS) was not correlated significantly to age, sex, tumor location, number of SPTs and p16 loss of expression. Multivariate analysis revealed statistically significant positive relation of DFS with cyclin-D1 overexpression (Cox regression model – p=0.015). Conversely overall survival (OS) was not correlated significantly to none of the clinical and IHC parameters investigated. Moreover, synergistic action of cyclin-D1 with p16 failed to reach statistical significant relation with either DFS or OS in all fashions of expres-

Table 3
Clinical and immunohistochemical patient data

Number of patient	Sex	Age	DFS (months)	OS (months)	p16 (%)	D1 (%)
1	F	66	0	39 m	2	30
					0	8
					0	20
2	F	49	11m	20m (died)	0	10
					0	20
3	M	55	3m	35m (died)	0	5
					1	5
4	F	64	72m	117m	0	40
					0	5
5	M	58	56m	84m (died)	0	20
					1	4
6	F	61	0	33m	0	4
					0	4
					0	5
7	M	43	18m	32m	0	10
					3	3
8	M	58	10m	80m (died)	0	5
					0	20
9	M	40	0	74m (died)	0	2
					4	3
10	F	69	8m	84m (died)	0	5
					3	5
					0	4
					0	5
					0	5
					0	10
					0	10
					0	4
					0	1
11	M	51	8m	94m	0	40
					0	8
					0	8
					0	5
12	F	63	10m	52m	4	10
					0	5
13	M	72	12m	55m	5	3
					8	10
14	F	52	6m	120m (died)	8	10
					1	4
					0	1
					0	1
					0	10
					0	1
					0	10
					0	10
					0	20
15	F	46	91m	216m (died)	0	30
					0	40
					0	10
					0	20
					-	30
					0	30
					0	30
16	M	59	30m	146m	10	5
					1	4
					0	3
					2	3
17	M	26	40m	264m	2	20
					0	40
18	M	73	0	51m	4	3
					15	10
19	F	36	10m	129m	0	10
					4	5
					0	2
20	F	52	11m	130m	0	10
					0	5
21	F	60	14m	24m (died)	2	10
					0	40
					0	40
22	F	65	13m	66m	0	10
					0	10
23	F	50	27m	250m	0	5
					2	4
					0	2
24	F	74	18m	36m	0	30
					0	20
25	F	64	7m	29m	0	20
					0	20
					0	10
					0	50
					0	20

P16%: percentage of p16 positive cancer cells. D1%: % percentage of cyclin D1 positive cancer cells. DFS: disease free survival OS: overall survival

1 και απώλεια της έκφρασης του p16, ομάδα 3: υπερέκφραση κυκλίνης D-1 και έκφραση του p16, ομάδα 4: αρνητική έκφραση της κυκλίνης D-1 και έκφραση του p16). Οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan – Meier για την ΕΕΝ (Εικ. 3) και ΟΕ (Εικ. 4) καταδεικνύουν την στατιστικά θετική συσχέτιση της υπερέκφρασης της κυκλίνης D-1 και της ΕΕΝ ($p<0.05$ log rank test).

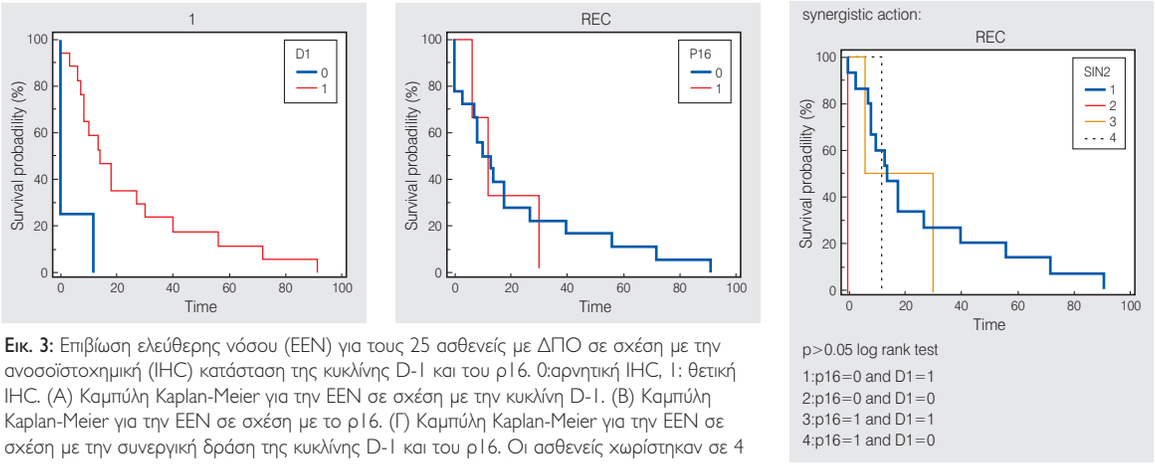
Συσχέτιση της υπερέκφρασης της κυκλίνης D-1με την απώλεια έκφρασης του p16

Παρόλο που η αυξανόμενη έκφραση της κυκλίνης D-1 φαίνεται να συνδέεται με μειούμενη έκφραση του

sion (group 1: cyclin-D1 overexpression with p16 loss of expression, group 2: cyclin-D1 negative for expression with p16 loss of expression, group 3: cyclin-D1 overexpression with p16 expression, and group 4: cyclin-D1 negative for expression with p16 expression). Kaplan –Meier survival curves for DFS and OS (Fig. 3, 4 respectively) demonstrate the positive relation of cyclin-D1 overexpression with DFS ($p<0.05$ log rank test).

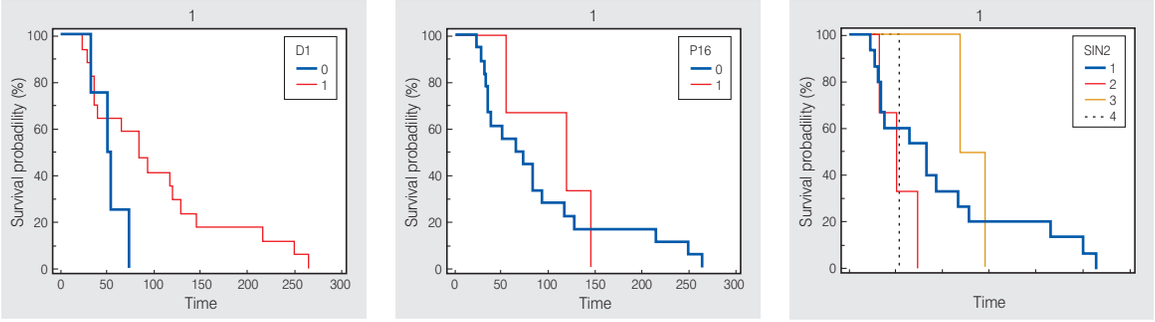
Relation between cyclin-D1 overexpression and p16 loss of expression

Although increasing expression of p16 is related to



Εικ. 3: Επιβίωση ελεύθερης νόσου (ΕΕΝ) για τους 25 ασθενείς με ΔΠΟ σε σχέση με την ανοσοϊστοχημική (IHC) κατάσταση της κυκλίνης D-1 και του p16. 0:αρνητική IHC, 1: θετική IHC. (Α) Καμπύλη Kaplan-Meier για την ΕΕΝ σε σχέση με την κυκλίνη D-1. (Β) Καμπύλη Kaplan-Meier για την ΕΕΝ σε σχέση με το p16. (Γ) Καμπύλη Kaplan-Meier για την ΕΕΝ σε σχέση με την συνεργική δράση της κυκλίνης D-1 και του p16. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 4 υποομάδες ανάλογα με τη θετικότητα ή αρνητικότητα των βλαβών στην υπερέκφραση της κυκλίνης D-1 και στην απώλεια του p16: 1:p16=0 and D1=1, 2:p16=0 and D1=0, 3:p16=1 and D1=1, 4:p16=1 and D1=0.

Fig. 3: Disease-free survival of 25 patients with second primary oral squamous cell carcinomas according to cyclin D1 and p16 status. 0: negative IHC, 1: positive IHC. (A) Kaplan-Meier curve for disease-free survival according to cyclin-D1 status. (B) Kaplan-Meier curve for disease-free survival according to p16 status. (C) Kaplan-Meier curve for disease-free survival according to synergistic action of cyclin-D1 and p16 status. Patients were divided to 4 subgroups based on whether they had tumors that were positive or negative for cyclin-D1 overexpression and p16 deletion. 1:p16=0 and D1=1, 2:p16=0 and D1=0, 3:p16=1 and D1=1, 4:p16=1 and D1=0.



Εικ. 4: Ολική επιβίωση (ΟΕ) για τους 25 ασθενείς με ΔΠΟ σε σχέση με την ανοσοϊστοχημική (IHC) κατάσταση της κυκλίνης D-1 και του p16. (Α) Καμπύλη Kaplan-Meier για την ΟΕ σε σχέση με την κυκλίνη D-1. (Β) Καμπύλη Kaplan-Meier για την ΟΕ σε σχέση με το p16. (Γ) Καμπύλη Kaplan-Meier για την ΟΕ σε σχέση με την συνεργική δράση της κυκλίνης D-1 και του p16.

Fig. 4: Overall survival of 25 patients with second primary oral squamous cell carcinomas according to cyclin D1 and p16 status. (A) Kaplan-Meier curve for disease-free survival according to cyclin-D1 status. (B) Kaplan-Meier curve for disease-free survival according to p16 status. (C) Kaplan-Meier curve for disease-free survival according to synergistic action of cyclin-D1 and p16 status. Immunohistochemical expression status and patient subgroup division are described in figure 3.

p16, η συσχέτιση αυτή απέτυχε τα εμφανιστεί στατιστικά σημαντική (Speraman's rank test p>0.05).

Συσχέτιση της έκφρασης της κυκλίνης D-1 και του p16 μεταξύ των πρωτοπαθών και των ΔΠΟ

Βρέθηκε διαφορετικό μοντέλο έκφρασης τόσο της κυκλίνης D-1 όσο και του p16 μεταξύ των πρωτοπαθών και των ΔΠΟ (Chi-square test – x^2, $p<0.05$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος της κυκλίνης D-1 ως ογκογονίδιο έχει καθιερωθεί από την ιδιότητά του να συνεργάζεται με άλλα ογκογονίδια με σκοπό την απορύθμιση του κυτταρικού κύκλου κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Η υπερέκφραση της κυκλίνης D-1 η οποία προκαλείται από γονιδιακή ενίσχυση, από χρωμοσωμική μετατόπιση ή

cyclin-D1 decreasing expression, the relation failed to reach statistical significance (Speraman's rank test p>0.05).

Relation between cyclin-D1 and p16 expression status of the index tumors and the first SPTs

Different mode of expression was identified between the index and the first SPTs concerning both cyclin-D1 and p16 (Chi-square test – x^2, $p<0.05$).

DISCUSSION

Cyclin-D1's role as an oncogene has been established by its ability to cooperate with other oncogenes in cell cycle dysregulation during multistep carcinogenesis. Overexpression of cyclin-D1 caused by gene amplification, chromosomal translocation or mitogenic stimula-

και από μιτογενετική διέγερση κατά την γονιδιακή μεταγραφή, έχει ενοχοποιηθεί για αρκετούς καρκίνους στον άνθρωπο, όπως του μαστού, του πνεύμονα, του οισοφάγου και της στοματικής κοιλότητας (Hinds και συν. 1994, Sicinski και συν. 1995). Αρκετές αναφορές έχουν δείξει ότι η γονιδιακή ενίσχυση ή η υπερέκφραση της κυκλίνης D-1 -που έχει ταυτοποιηθεί σε περίπου 40% του καρκίνου του στόματος- αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα του καρκίνου του στόματος, ως υπεύθυνη για φτωχή πρόγνωση, αυξημένη επιθετικότητα του όγκου, καθώς και μειωμένη ολική επιβίωση και επιβίωση ελεύθερης νόσου (Ballacosa και συν. 1996, Kyomoto και συν. 1997, Akervall και συν. 1997). Κατά παρόμοιο τρόπο, η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης p16 -που βρίσκεται σε περίπου 80% των ασθενών με στοματικό καρκίνο- ως μέλος των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CDKis), πολύ συχνά παρατηρείται σε διάφορους τύπους καρκίνου (Papadimitrakopoulou και συν. 1997). Η ρύθμιση της μειωμένης έκφρασης της πρωτεΐνης p16 από χρωμοσωμική διαγραφή, σημειακή μετάλλαξη ή υπερμεθυλίωση βάσεων φαίνεται να αποτελεί πρώιμο γεγονός στη διαδικασία των πολλαπλών σταδίων της καρκινογένεσης (Sanchez-Cespedes και συν. 2000). Απώλεια της έκφρασης του p16 έχει βρεθεί ακόμα και σε υπερπλασίες ή και δυσπλασίες (Rosin και συν. 2000) και έχει συνδεθεί με κακή πρόγνωση (Sakagushi και συν. 1996, El-Nagger και συν. 1999). Παρόλα αυτά παραμένει η συζήτηση σχετικά με την προγνωστική σημασία του p16 για τον ακανθοκυτταρικό καρκίνο της στοματικής κοιλότητας. Αρκετές αναφορές καταδεικνύουν την σημαντική σχέση της διαγραφής του p16 με απομακρυσμένες μεταστάσεις και χαμηλότερα επίπεδα κυτταρικής διαφοροποίησης, ενώ άλλοι ερευνητές απέτυχαν να αναδείξουν σημαντική σχέση μεταξύ του p16 και της ΕΕΝ και ΟΕ (Namazie και συν. 2002, Uzawa και συν. 2007). Αντίθετα, η συνεργική δράση μεταξύ της υπερέκφρασης της κυκλίνης D-1 και της απώλειας του p16, έχει βρεθεί να επηρεάζει ισχυρότερα την μείωση τόσο της ΕΕΝ όσο και της ΟΕ, από ότι μόνες τους η κυκλίνη D-1 και το p16. Εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι η ενίσχυση της κυκλίνης D-1 και η απενεργοποίηση του p16 μπορούν να επιταχύνουν την G-1 φάση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και ότι η συνεργική δράση τους συνδέεται με φτωχή πρόγνωση στον καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (Lukas και συν. 1995, Jadayel και συν. 1997).

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε ο ρόλος της υπερέκφρασης της κυκλίνης D-1 και της απώλειας της έκφρασης του p16 σε συνδυασμό με άλλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, σε σχέση με την επιβίωση ελεύθερης νόσου (ΕΕΝ) και την ολική επιβίωση (ΟΕ) σε 25 ασθενείς με 80 συνολικά ΔΠΟ σταδίου I και II. Το μη αναμενόμενο αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης αφορά στην στατιστικά σημαντική σχέση της υπε-

tion of gene transcription has been implicated in several human cancers including breast carcinoma, lung carcinoma, esophagus carcinoma and HNSCC especially oral cancer (Hinds et al. 1994, Sicinski et al. 1995). Many reports have indicated gene amplification or overexpression of cyclin-D1 –found in almost 40% of invasive OSCC- to be a potent prognostic factor in oral carcinomas, responsible for poor prognosis, tumor aggressiveness and reduced DFS and OS (Ballacosa et al. 1996, Kyomoto et al. 1997, Akervall et al. 1997). Similarly, loss of p16 protein expression -found in almost 80% of invasive OSCC- as a member of cyclin depended kinase inhibitors (CDKis), is frequently observed in a variety of human cancers (Papadimitrakopoulou et al. 1997). Down-regulation of p16 protein expression caused by chromosomal deletion, point mutation or promoter hypermethylation (Sanchez-Cespedes et al. 2000) is believed to constitute an early event in multistep carcinogenesis found in squamous hyperplasia and dysplasia (Rosin et al. 2000) and is correlated with poor prognosis (Sakagushi et al. 1996, El-Nagger et al. 1999). However, debate still remains regarding the prognostic significance of p16. Many reports postulate p16 deletion to have a significant association with distant metastasis and cellular differentiation, whereas other researchers failed to prove significant correlation of p16 to DFS and OS (Namazie et al. 2002, Uzawa et al. 2007). Reversely, synergistic action of cyclin-D1 overexpression and p16 deletion is found to have a more potent impact on reduced DFS and OS in OSCC than cyclin-D1 or p16 alone. In vitro studies have indicated that amplification of cyclin-D1 and inactivation of p16 can accelerate G1 phase of the cell cycle, whereas other studies postulate that synergistic action of cyclin-D1 amplification and p16 deletion correlate with poor prognosis in HNSCC (Lukas et al. 1995, Jadayel et al. 1997).

In the present study we investigated the role of cyclin-D1 overexpression and p16 loss of expression in addition to other clinicopathological data with respect to two outcome parameters: DFS and OS, in 25 patients with 80 stage I and II second primary oral SCC. The unexpected outcome of our study was the significant correlation of cyclin-D1 overexpression with improved DFS and the failure to associate with reduced OS. In addition, cyclin-D1 overexpression was proved to be irrelevant to p16 loss of function, whereas in doubly mutated cells synergistic action of cyclin-D1 and p16 in all modes of expression seemed to have no impact on clinical outcome in patients with SPTs.

Although almost all previous reports have demonstrated that elevated expression of cyclin-D1 provides a proliferate advantage to the tumor cells, second primary tumor cells in patients with OSCC could have a different clinical outcome, following distinct molecular

ρέκφρασης της κυκλίνης D-1 με την αύξηση της ΕΕΝ και την αποτυχία να συνδεθεί σημαντικά με μείωση της ΟΕ. Ταυτόχρονα η υπερέκφραση της κυκλίνης D-1 βρέθηκε να μην επηρεάζει την απώλεια λειτουργίας του p16, ενώ και σε κύτταρα με διπλή μετάλλαξη, η συνεργική δράση της κυκλίνης D-1 και του p16 σε όλους τους συνδυασμούς πρωτεϊνικής έκφρασης δεν φάνηκε να επηρεάζει το κλινικό αποτέλεσμα στους ασθενείς με δεύτερο πρωτοπαθή όγκο (ΔΠΟ).

Σε αντίθεση με σχεδόν όλες τις προηγούμενες αναφορές, οι οποίες καταδεικνύουν ότι η αυξημένη έκφραση της κυκλίνης D-1 εξασφαλίζει πλεονέκτημα κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα καρκινικά κύτταρα, τα κύτταρα των ΔΠΟ σε ασθενείς με καρκίνο του στόματος πιθανόν προσδίδουν διαφορετική κλινική εικόνα ακολουθώντας ένα ξεχωριστό μοριακό μονοπάτι κατά τη διάρκεια της G-1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Οι Gillett και συν. (1996) έδειξαν ότι ανώμαλη συσσώρευση της κυκλίνης D-1 συνδέεται με βελτιωμένο κλινικό αποτέλεσμα στον καρκίνο του μαστού, ενώ άλλοι ερευνητές δεν κατάφεραν να αποδείξουν την προγνωστική αξία της ενίσχυσης του συγκεκριμένου γονιδίου (11q13 amplification) (Peters και συν. 1995).

Μία πιθανή ερμηνεία αυτής της αντίστροφης δράσης της υπερέκφρασης της κυκλίνης D-1 θα μπορούσε να είναι η απώλεια της λειτουργικότητας του ρετινοβλαστώματος λόγω κάποιας μετάλλαξης που οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της κυκλίνης D σε κύτταρα αρνητικά στο Rb, καθιστώντας την ανίκανη να συνδεθεί με τις cdk4/6 (Bates και συν. 1994, Tam και συν. 1994). Κύτταρα χωρίς λειτουργικό Rb εμφανίζουν υψηλά επίπεδα p16, με αποτέλεσμα οι κινάσες cdk4 και cdk6 να απομονώνονται σε ανενεργά συμπλέγματα (Parry και συν. 1995, Pande και συν. 1998). Επιπλέον, άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η ταυτοποίηση αλλοιωμένης έκφρασης της πρωτεΐνης cdk6 σε κυτταρικές σειρές ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του στόματος πιθανότατα ευθύνεται για αυτό το διαφορετικό μοριακό μονοπάτι. Μία τέτοια υπερλειτουργία σε έδαφος απουσίας της κυκλίνης D-1 πιθανότατα ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω της γρήγορης μετάβασης από το σημείο G1/S του κυτταρικού κύκλου (Timmermann και συν. 1997). Βέβαια, απαιτείται περαιτέρω έρευνα προκειμένου να αποκαλυφθεί πλήρως αυτό το ενδιαφέρον μονοπάτι και να αποσαφηνίσει τον ακριβή ρόλο της κυκλίνης D-1 στην G-1 φάση του κυτταρικού κύκλου.

Ένα ακόμη ενδιαφέρον αποτέλεσμα της παρούσας προγνωστικής μελέτης αποτέλεσε η μικρότερη ηλικιακή κατανομή (μέση ηλικία 56 έτη), καθώς και η προτίμηση στο γυναικείο φύλο (1,5/1 γυναίκες προς άνδρες) στους ασθενείς με ΔΠΟ σε σύγκριση με τα 63.1 έτη μέσης ηλικίας και με καθαρή προτίμηση στους άνδρες (2,5/1 άνδρες προς γυναίκες) στο σύνολο των 232 ασθενών με καρκίνο του στόματος. Επιπλέον η

pathway during the G1 phase of the cell cycle. Gillett et al. (1996) indicated that aberrant accumulation of cyclin-D1 is associated with improved clinical outcome in human breast cancer, whereas other researchers failed to provide a consistent message about the prognostic value of 11q13 amplification (Peters et al. 1995). A possible explanation of this reverse action of cyclin-D1 overexpression could be loss of Rb function caused by mutation, resulting in D-type cyclin destabilization in Rb-negative cells, becoming unable to associate with cdk4/6 (Bates et al. 1994, Tam et al. 1994). Cells that lack functional pRb express high levels of p16, so that cdk4 and cdk6 become sequestered in inactive complexes (Parry et al. 1995, Pande et al. 1998). Moreover, other researchers point out the altered cdk6 expression detected in OSCC cell lines as the possible reason of this different molecular pathway. A specific hyperactivity in the absence of cyclin-D1 overexpression may enhance cell proliferation promoting G1/S pathway (Timmermann et al. 1997). Of course, further research will be required in order to unravel this intriguing pathway and clarify the exact role of cyclin-D1 in the G1 phase of the cell cycle.

Another interesting result of the present prognostic study was the younger age of the patients with SPTs (mean 56 years) and a female predilection (1.5:1 females to males) compared to 63.1 years mean age and a clear male predilection (2.5:1 males to females) in the cohort of 232 patients with OSCC. Moreover, the statistical significant altered expression of both p16 and cyclin-D1 between the index and the first SPT could be indicative of multiclonal origin of such tumors despite new theories of common clonal origin for the paired tumors (Ha and Califano, 2003). Early genetic events especially p16 mutation shared by second primary tumors are suggested to be the result of the submucosal migration of transformed daughter cells (Braakhuis et al. 2004). However, the clonality of multiple tumors is still controversial as other researchers detected discordant genetic alterations between paired tumors (Van Oijen et al. 2000, Jang et al. 2001). The implications in the present study of different genetic profile of the SPTs to the index tumors regarding p16 and cyclin-D1 expression possibly enhances this controversy.

CONCLUSIONS

Patients with SPTs seem to outline a distinct entity in terms of clinicopathological behavior and genetic profile of the tumor cells. Younger patient age, female predilection and implications for multiclonality of the SPTs, give rise to this possible modification. Moreover, the different prognostic value of cyclin-D1 overexpression and p16 loss of function in patients with SPTs

στατιστικά σημαντική διαφορετική έκφραση της κυκλίνης D-1 και του p16 μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και του πρώτου ΔΠΟ είναι ενδεικτική πολυκλωνικής προέλευσης των όγκων αυτών παρά τις πρόσφατες αναφορές για πιθανή μονοκλωνική αρχή των ΔΠΟ (Ha και Califano, 2003). Πρώιμα γενετικά γεγονότα όπως η μετάλλαξη του p16 σε όλους τους ΔΠΟ πιθανολογήθηκε ως αποτέλεσμα μίας υποβλεννογόνιας μετανάστευσης μεταλλαγμένων θυγατρικών κυττάρων (daughter cells) (Braakhuis και συν. 2004). Παρόλα αυτά η κλωνικότητα των πολλαπλών όγκων παραμένει αμφιλεγόμενη καθώς άλλοι ερευνητές ανίχνευσαν διαφορετικές γενετικές αλλοιώσεις στις δεύτερες πρωτοπαθείς βλάβες (Van Oijen και συν. 2000, Jang και συν. 2001). Οι αναφορές στην παρούσα μελέτη για πιθανό διαφορετικό γενετικό προφίλ των ΔΠΟ ως προς την έκφραση της κυκλίνης D-1 και του p16 ενισχύουν αυτή την αμφισβήτηση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι ασθενείς με ΔΠΟ φαίνεται να συνιστούν μία διαφορετική γενετική και κλινικοπαθολογική οντότητα. Η μικρότερη ηλικία εμφάνισης, η προτίμηση στο γυναικείο φύλο και οι υπαινιγμοί πολυκλωνικότητας των όγκων αυτών ενισχύουν αυτή την πιθανή διαφοροποίηση. Επιπλέον, η διαφορετική προγνωστική αξία της υπερέκφρασης της κυκλίνης D-1 και της απώλειας της λειτουργικότητας του p16 σε ασθενείς με ΔΠΟ ισχυροποιούν αυτή τη διαπίστωση. Είναι όμως απαραίτητη περαιτέρω έρευνα ενδεχομένως με μεγαλύτερο δείγμα ασθενών με ΔΠΟ ή με μοριακή ανάλυση και άλλων δεικτών προκειμένου να επαληθευτούν νέες διαγνωστικές μέθοδοι και καινούρια θεραπευτικά πρωτόκολλα για τους ασθενείς αυτούς.

makes our verification more potent. This of course needs to be further clarified by other researchers possibly with a larger series of patients with paired tumors, or with molecular analysis of other markers in order to establish accurate prognosis and new treatment proposals for these patients.

Πηγές χρηματοδότησης: Υπουργείο Παιδείας Δια Βίου Μάθησης και Θρησκευμάτων, Πρόγραμμα: «Πυθαγόρας ΙΙ»
The paper is supported: Ministry of Education, Lifelong Learning and Religious Affairs, Program: «Πυθαγόρας ΙΙ»

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ/REFERENCES

Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H: Amplification of cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. Cancer 79:480–389, 1997

Ballacosa A, Almadori G, Cavallo S: Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications. Clin Cancer Res 2:175–180, 1996

Bates S, Parry D, Bonetta L, Vousden K, Dickson C, Peters G: Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein. Oncogene 9: 1633-1640, 1994

Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, Cole IE, Sheridan BF, Jensen MJ: Cyclin D1 and p16^{INK4A} expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. Clin Cancer Res 5:2810-2819, 1999

Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH: A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. J Oral Pathol Med 33: 317-322, 2004

Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, Van Der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH: Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. Head Neck 24:198–206, 2002

Califano J, Van Der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Plantadosi S: Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res 56:2488–92, 1996

El-Nagger AK, Lai S, Clayman GL: Expression of p16, Rb, and cyclin D1 gene products in oral and laryngeal squamous carcinoma: biological and clinical implications. Hum Pathol 30:1013–1018, 1999

Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, Barnes D: Cyclin d1 and prognosis in human breast cancer Int J Cancer (Pred Oncol) 69: 92-99, 1996

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murrary T, Thun M: Cancer statistics, 2001. CA Cancer J Clin 51:15–36, 2001

Ha PK, Califano J: The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. Crit Rev Oral Biol Med 14(5): 363-369, 2003

Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A, Weinberg RA: Function

of a human cyclin gene as an oncogene. Proc Natl Acad Sci USA 91:709-713, 1994
Hong WK, Lippman SM, Itri LM: Prevention of second primary tumors with isotretinoinin in squamous cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med 323:795-801, 1990
Jadayel DM, Lukas J, Nacheva E: Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphoma: functional studies in a cell line (Grant 519). Leukemia 11:64–72, 1997
Jang SJ, Chiba I, Hirai A, Hong WK, Mao L: Multiple oral squamous epithelial lesions: are they genetically related? Oncogene 20:2235–42, 2001
Kyomoto R, Kumazawa H, Toda Y: Cyclin D1 gene amplification is a more potent prognostic factor than its protein overexpresion in human head and neck squamous cell carcinoma. Int J Cancer 74:576–581, 1997
Leong PP, Rezai B, Koch WM: Distinguishing second primary tumors from lung metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. J Natl Cancer Inst 90: 972-977, 1998
Lukas J, Aagaard L, Strauss M, Bartek J: Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control. Cancer Res 55:4818–4823, 1995
Michailides RJ, Van De Brekel M, Balm F: Defects in G1-S cell cycle control in head and neck cancer: a review. Head Neck 24:694–704, 2002
Miyamoto R, Uzawa N, Nagaoka S: Prognostic significance of cyclin D1 amplification and overexpression in oral squamous cell carcinomas. Oral Oncol 39:610–618, 2003
Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohamadi N, Aghamohamadi M: Cyclin D1 amplification and P16 (MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. Laryngoscope 112:472–481, 2002
Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R: PRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. Oral Oncol 34:396-403, 1998
Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM: Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. Oncogene 14:1799–1803, 1997
Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G: Lack of cyclin D-Cdk corn lexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTsP tumour suppressor gene product. EMBO I 14: 503-511, 1995
Pateromichelakis S, Farahini M, Phillips E, Partridge M: Molecular analysis of paired tumours: Time to start treating the field. Oral Oncol 41:916–926, 2005
Peters G, Fantl V, Smith R, Brookes S, Dickson C: Chromosome llq13 markers and D-type cyclins in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 33:125-135, 1995
Rosin MP, Cheng X, Poh C: Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. Clin Cancer Res 6:357–62, 2000
Sakagushi M, Fuji Y, Hirabayashi H: Inverse correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study. Int J Cancer 65:442–445, 1996
Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM: Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. Cancer Res 60:892-895, 2000
Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H: Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. Cell 82:621-630, 1995
Slaughter DP, Southwick HW: "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. Cancer 6:963–8, 1953
Tam SW, Theodoras AM, Shay JW, Draetta GF, Pagano M: Differential expression and regulation of cyclin D1 protein in normal and tumor cells: association with Cdk4 is required for cyclin D1 function in G, progression. Oncogene 9: 2663-2674, 1994
Timmermann S, Hinds P, Munger K: Elevated activity of cyclin-dependent kinase 6 in human squamous cell carcinoma lines. Cell Growth Diff 8:361-370, 1997
Uzawa N, Sonoda I, Myo K, Takahashi K, Miyamoto R, Amagasa T: Fluorescence in Situ Hybridization for Detecting Genomic Alterations of Cyclin D1 and p16 in Oral Squamous Cell Carcinomas. Cancer 110(10): 2230-2239, 2007
Van Oijen MG, Slootweg PJ: Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9:249–56, 2000
Warren S, Gates O: Multiple primary malignant tumors. A survey of the literature and a statistical study. Am J Cancer 16: 1358-1414, 1932

Διεύθυνση επικοινωνίας:
Μαγόπουλος Χρήστος
Καλλιπάτειρας 4
Πυλαία Θεσσαλονίκη
Τηλ.: 2310949711
e-mail: magopoul@dent.auth.gr

Address:
Magopoulos Christos
Kallipatiras 4
Thessaloniki - Greece
Tel.: +30231094971 1
e-mail: magopoul@dent.auth.gr