

Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες στα νεοπλάσματα του παχέος εντέρου (αδενώματα - συνήδη αδενώματα)

Α.Χ. Λάζαρης , Π.Σ. Δάβαρης

Λέξεις κλειδιά: ανοσοϊστοχημεία, νεοπλασία παχέος εντέρου, πρόγνωση

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πέρα από τη μικροσκοπική μελέτη της μορφολογίας, τα τελευταία χρόνια, γίνεται προσπάθεια προσδιορισμού της βιολογικής συμπεριφοράς των νεοπλασμάτων στον άνθρωπο μέσω της έκφρασης ποικίλων μορίων στα κύτταρα των όγκων ή και σε εκείνα του ξενιστή οργανισμού. Όμως, η ανεξάρτητη, απευθείας επίδραση της ανίχνευσης των παραπάνω μορίων στην επιβίωση των καρκινοπαδών αμφισβητείται έντονα: άρα, πρέπει να γίνει σαφές ότι ο **οχολαστικός καθορισμός των κλασικών, αναντικατάστατων κλινικοϊστοπαθολογικών παραμέτρων** εξακολουθεί πάντα να αποτελεί τη στέρεη βάση πάνω στην οποία ο Κλινικός Ογκολόγος θα στηρίξει την πρόγνωση του κάθε ασθενούς. Έτσι, η όποια αξία των **νεότερων βιολογικών δεικτών** φαίνεται να περιορίζεται στον καθορισμό **υποομάδων** ασθενών, π.χ. με όγκους κάποιου συγκεκριμένου σταδίου ή κάποιου συγκεκριμένου βαθμού κακοηθείας οι οποίοι εμφανίζουν κάποιο προγνωστικό πλεονέκτημα ή μειονέκτημα σε σχέση με τους υπολοίπους ασθενείς με όγκους του αυτού σταδίου ή του αυτού βαθμού κακοηθείας. Για να εξαχθούν ασφαλή

συμπεράσματα, χρειάζεται αναζήτηση της παρουσίας κάθε νέου βιολογικού δείκτη με αξιόπιστες τεχνικές σε ξεχωριστές, μεγάλες σειρές ασθενών από διάφορα ερευνητικά κέντρα. Με τη συνεχώς βελτιούμενη ευαισθησία και ειδικότητα των παρασκευαζομένων πρωτογενών αντισωμάτων, η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί μια συχνά αξιόπιστη, εύχρηστη μέθοδο μελέτης αρκετών βιολογικών δεικτών σε επίπεδο πρωτεΐνης, αρκεί να πληρούνται προσεκτικά όλες οι απαιτούμενες τεχνικές προδιαγραφές. Πάντως, χρειάζεται να υπάρχει επίγνωση των ορίων της συγκεκριμένης μεθόδου συγκριτικά με τις ολοένα εξελισσόμενες μοριακές τεχνικές των οποίων, παρεπιπτόντως, η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί συχνά χρήσιμο συμπλήρωμα.

Στο παρακάτω κείμενο ανασκοπούμε επιλεκτικά μόνον όσους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες, πιθανολογούμενης προγνωστικής σημασίας, έχουμε εξετάσει σε σποραδικά (μη οικογενή και μη σχετιζόμενα με ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσους) νεοπλάσματα του παχέος εντέρου, στα πλαίσια των δραστηριοτήτων του Παθολογικού Ανατομείου του Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την τελευταία πενταετία. Παρατίθενται οι συσχετίσεις που προέκυψαν μεταξύ της έκφρασης των δεικτών αυτών και των κλασικών κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων που είχαν εκτιμηθεί στα εν λόγω νεοπλάσματα.

1. ΚΑΡΚΙΝΟΕΜΒΡΥΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (CEA)¹

Το CEA είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους η οποία φυσιολογικά παράγεται σε εμβρυικούς ιστούς από τον πεπτικό σωλήνα, το πάγκρεας και το ήπαρ. Στους ενήλικες, αυξημένες συγκεντρώσεις στον ορό του αίματος συνοδεύουν ορισμένα καρκινώματα, μεταξύ των οποίων το 60-90% των αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου, αλλά και καλοήθεις διαταραχές (π.χ. αλκοολική κίρρωση, ηπατίτιδα, ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου).

Προτεινόμενος **δετικός μάρτυρας** για ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του CEA: Τομές αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου. Προτεινόμενος **αρνητικός μάρτυρας**: φυσιολογικό δέρμα.

- Προεγχειρητικά, στους εξετασθέντες καρκινοπαθείς, το CEA ανιχνεύθηκε στο 53,3% των ορών, ενώ, μετά την επέμβαση, με ανοσοϊστοχημική τεχνική στο 48,8% των όγκων.

- Ταυτόχρονη ορολογική και ανοσοϊστοχημική δετικότητα παρατηρήθηκε στο 58,3% των ορολογικά δετικών ασθενών, ενώ σε 38% των ορολογικά αρνητικών ασθενών κατέστη δυνατή η ιστική ανίχνευση του δείκτη.

- Ο παρακείμενος των όγκων, δυσπλαστικός βλεννογόνος συχνά χαρακτηριζόταν από ανοσοϊστοδετικότητα στο CEA.

Η μετεγχειρητική αξιολόγηση των αυξημένων επιπέδων του CEA ως δείκτη εναπομείνου, υπολειματικού όγκου ή ως, αμφιβόλου έστω, δείκτη τοπικής υποτροπής πρέπει να συναρτάται: α) με το κατά πόσο τα καρκινικά κύτταρα είναι εκείνα που κατά κύριο λόγο εκφράζουν το συγκεκριμένο αντιγόνο σε ιστικό επίπεδο πρωτοπαδούς εστίας και β) με την εντόπιση της δετικής ανοσοϊστοχημικής χρώσης στα κακοήδη κύτταρα. Συγκεκριμένα, ενώ οι δετικές περιπτώσεις μας στις οποίες το CEA παρουσίαζε διάχυτη πρωτοπλασματική χρώση συνοδεύονταν από αυξημένα επίπεδα CEA στο πλάσμα, σε εκείνες που η δετική χρώση περιοριζόταν στην ελεύθερη επιφάνεια των κακοήδων κυττάρων, σπάνια τα ορολογικά επίπεδα του CEA ήταν πάνω από το όριο των 10 ng/ml.

2. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΑΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ (TPA)²

Το αντιγονικό πολυπεπίδιο TPA αρχίζει να

παράγεται κατά τη φάση σύνδεσης του DNA (φάση S) του κυτταρικού κύκλου αναγεννώμενων επιθηλιακών κυττάρων και τα ορολογικά επίπεδα συκέντρωσής του δυνητικώς αντανakλούν τη δυνατότητα πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.

- Το 73,3% των καρκινωμάτων που εξετάσαμε επέδειξαν έντονη ανοσοχρώση για το TPA στο κυτταρόπλασμα των κακοήδων κυττάρων, στη μεταβατική προς τον καρκίνο βλεννογονική ζώνη και, σε σαφώς ασθενέστερη ένταση, στον απομακρυσμένο, μη δυσπλαστικό βλεννογόνο.

- Ο εν λόγω δείκτης συσχετίστηκε μετά από μονοπαραγοντική στατιστική ανάλυση με χαμηλή διαφοροποίηση των όγκων ($p < 0,01$) και με χειρότερη επιβίωση των ασθενών ($p < 0,05$).

- Στις λεμφαδενικές μεταστάσεις η ένταση της δετικής χρώσης ήταν ιδιαίτερα υψηλή.

Πιθανολογείται ότι η υπερέκφραση του δείκτη χαρακτηρίζει, ιδιαιτέρως, μονοκλωνικής προέλευσης νεοπλασματικά κύτταρα που κατά κανόνα απαρτίζουν τον πληθυσμό των όγκων χαμηλής διαφοροποίησης οι οποίοι δίνουν και συντομότερα μεταστάσεις.

Στο νεοπλασματικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό εμπλέκεται η εμμένουσα ενεργοποίηση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων και η ενδοκυττάρια μεταγωγή συνεχών μιτογόνων ερεθισμάτων με επακόλουθο την αυξημένη σύνδεση DNA από τα εξαλλαγέντα κύτταρα κι ενδεχομένως την απόκτηση μεταστατικού δυναμικού από αυτά. Στο παραπάνω πλαίσιο εντάσσεται η μελέτη αυξητικών παραγόντων, ενεργοποιημένων ογκογονιδίων και αδρανοποιημένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων³.

3. ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΕΠΙΔΕΡΜΙΚΟΥ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ (EGF-R)⁴

Οι αυξητικοί παράγοντες είναι πολυπεπτιδικές ορμόνες διεγείρουσες τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Δομικές μεταβολές και παθολογική υπερέκφραση των υποδοχέων τους έχουν ανακαλυφθεί σε αρκετά νεοπλάσματα. Η οικογένεια των διαμεμβρανικών υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (του EGF) περιλαμβάνει τα μέλη c-erbB-1, 2 και 3. Η διείσδυση συμπλεγμάτων EGF και EGF-R στο πρωτόπλασμα θεωρείται ότι προάγει τη σύνδεση του DNA μεταδίδοντας ενδοκυττάρια μηνύματα με την ενεργοποίηση μιας κινάσης που φωσφορυλιώνει συγκεκριμένα υπολείματα τυ-

ροσίνης.

Προτεινόμενος **θετικός μάρτυρας** για τις χρώσεις: φυσιολογικό δέρμα. Προτεινόμενος **αρνητικός μάρτυρας**: ανδρώπινος εγκεφαλικός ιστός.

Ο EGF-R:

- εκφράστηκε στο 67% των εξετασθέντων αδενοκαρκινωμάτων (μεμβρανική ή και κυτταροπλασματική θετικότητα).

- συσχετίσθηκε με χαμηλή διαφοροποίηση των όγκων ($p < 0,05$)

- εκφράστηκε σε μεγαλύτερα ποσοστά καρκινικών κυττάρων στο στάδιο D απ' ότι στο στάδιο B κατά Dukes (διαφορές μέσω των τιμών t-test: 2,68, $p < 0,05$).

Τα κακοήδη κύτταρα που εκφράζουν σε μεγάλα ποσοστά τον EGF-R φαίνεται να βρίσκονται σε στάδιο με αυξημένη τάση για ανάπτυξη, γεγονός που τους επιτρέπει να φθάνουν σε προχωρημένα κλινικά στάδια, πιθανώς βοηθούμενα κι από τον ανοσοκατασταλτικό ρόλο που μπορεί να παίζει ο EGF σε τοπικό επίπεδο.

Πάντως, πρέπει να τονισθεί ότι και ο TGF-α μπορεί επίσης να επιδράσει στον κυτταρικό αναδιπλασιασμό συνδεόμενος με τον EGF-R επομένως, η ανίχνευση του EGF-R στα νεοπλασματικά κύτταρα δε σημαίνει απαραίτητα ότι τα τελευταία θα εξαρτώνται από τον EGF για την ανάπτυξή τους. Η αρνητική χρώση για τον EGF-R μπορεί, από τη μια πλευρά, να οφείλεται στην απουσία περιοχών πρόσδεσης στην κυτταρική επιφάνεια, αλλά μπορεί να οφείλεται και στην κατάληψη και καταστολή του υποδοχέα ως απάντηση στην ενεργοποίηση των κυττάρων από τον EGF ή/και τον TGF-α.

4. ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ c-erbB-2 ΚΑΙ p53 ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ 17^{5,6}

Το γονίδιο c-neu (το οποίο κωδικεύει την ογκοπρωτεΐνη c-erbB-2) ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, ο δε ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός της αντίστοιχης ογκοπρωτεΐνης υποδηλώνει την υπερέκφραση του εν λόγω γονιδίου. Το φυσιολογικό p53 γονίδιο (wild-type) φαίνεται να αποτρέπει την παραγωγή γενετικώς αλλοιωμένων κυττάρων. Η μεταλλαγμένη μορφή του γονιδίου που κωδικοποιεί συνήθως και την ανοσοϊστοχημικώς ανιχνεύσιμη πρωτεΐνη σε μεγάλα ποσοστά καρκινικών κυττάρων, επιτρέπει να σταθεροποιηθούν οι καρκινογόνες με-

ταλλάξεις στο γενετικό υλικό των κυττάρων κι έτσι συνεισφέρει στην καρκινογένεση, ειδικότερα στα προχωρημένα στάδια εξαλλαγής αδενωμάτων προς διηθητικά καρκινώματα.

Προτεινόμενοι **θετικοί μάρτυρες** για τους δύο δείκτες: κατάλληλα καρκινώματα μαστού. Προτεινόμενος **αρνητικός μάρτυρας** για την p53 πρωτεΐνη: φυσιολογικό δέρμα.

Η **συνέκφραση** των δύο πρωτεϊνών:

- ανιχνεύθηκε στο 23,3% των εξετασθέντων καρκινωμάτων

- συσχετίσθηκε με προχωρημένα στάδια κατά Dukes ($p < 0,001$), χαμηλή διαφοροποίηση των όγκων

- ($p < 0,01$), υψηλή μιτωτική δραστηριότητα ($p < 0,001$), ανευπλοειδία του DNA των καρκινικών βλαστών ($p < 0,05$) και φτωχή πρόγνωση ($p < 0,05$).

Κατά τη διαδικασία της καρκινογένεσης ενισχύεται η γενετική αστάθεια των κακοήθων κυττάρων με αποτέλεσμα επιπρόσθετες γενετικές αλλοιώσεις να καθορίζουν δυσμενώς την εξέλιξη των όγκων. Τα προϊόντα έκφρασης του ογκογόνου γονιδίου c-erbB-2 και του αδρανοποιημένου p53 γονιδίου εμπλέκονται στην επιθετική συμπεριφορά των αντιστοιχών αδενοκαρκινωμάτων. Ειδικότερα για το p53, ο προσδιορισμός συγκεκριμένων μεταλλαγμένων κωδικονίων (ιδιαίτερος του 175) με μοριακές τεχνικές εγγυάται δυσμενή εξέλιξη της νόσου και συνδέεται με ιδιαίτερους κλινικοϊστοπαθολογικούς χαρακτήρες των όγκων⁷.

5. ΠΥΡΗΝΙΚΟ ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΖΟΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ (PCNA)^{8,9}

Το PCNA είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που δρα ως βοηθητικό μόριο για τη DNA πολυμεράση-δ κατά την επιμήκυνση της οδηγού αλυσίδας στη σύνθεση του DNA· ανιχνεύεται δε σε αυξημένα επίπεδα σε ταχέως αναδιπλασιαζόμενα κύτταρα.

Προτεινόμενος **θετικός μάρτυρας**: τομές αμυγδαλής.

- Το μέσο ποσοστό θετικών καρκινικών πυρήνων για το PCNA ήταν 50,4%, ενώ σε ομάδα ελέγχου με αδενώματα, το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 38% κι ήταν στατιστικώς μικρότερο ($p < 0,05$).

- Το ποσοστό των PCNA θετικών νεοπλασματικών κυττάρων συσχετίσθηκε με το ποσοστό της S-φάσης ($r = +0,8$) όπως αυτό προσδιορίστηκε με μαθηματική ανάλυση ιστογραμμά-

των κυτταρομετρίας ροής.

- Τα αδενώματα με μεταλλαγή στο γονίδιο K-ras (ταυτοποιούμενη με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης) χαρακτηρίζονται από αυξημένα PCNA ποσοστά ($t_{31}=4,774$, $p<0,001$).

Το PCNA μπορεί να χρησιμεύσει ως δείκτης κυτταρικού αναδιπλασιασμού στη νεοπλασία του παχέος εντέρου η δε αυξημένη ανοσοϊστοδοδετικότητα του συνδέεται με την ενεργοποίηση του ογκογονιδίου K-ras σε προκαρκινωματώδεις φάσεις. Είναι αλήθεια ότι ο υψηλός ρυθμός αναδιπλασιασμού αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης μεταλλάξεων. Από την άλλη πλευρά όμως, μετά από μια μη διορθούμενη μεταβολή του DNA χρειάζεται μια φάση αναδιπλασιασμού έτσι ώστε η αλλαγή στο DNA να μονιμοποιηθεί από εκεί και πέρα. Παρότι ένας αρχικός παράγοντας μπορεί να προκαλέσει τη μεταλλαξιγόνο ενεργοποίηση του ras ογκογονιδίου, οι περαιτέρω προαγωγείς είναι εκείνοι που οδηγούν σε αναδιπλασιασμό τα μεταλλαγμένα κύτταρα, οπότε αυτά υφίστανται περαιτέρω μεταλλάξεις που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός κακοήθους όγκου.

Πάντως, για να καθοριστεί κατά πόσον ο αυξημένος ρυθμός αναδιπλασιασμού προδικάζει αυξημένη βιολογική επιθετικότητα επιβάλλεται συνεκτίμηση της αποπτωτικής τάσης των κακοήθων κυττάρων δηλ. του ρυθμού προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου τους. Προσοχή χρειάζεται και στις συνθήκες μονιμοποίησης των υπό εξέταση ιστικών δειγμάτων και στην αξιολόγηση της ανοσοϊστοδοδετικότητας του PCNA, καθώς η παρατεταμένη έκφρασή του μπορεί να είναι αποτέλεσμα αυτοκρινούς ή παρακρινούς επίδρασης μέσω λειτουργικών αυξητικών παραγόντων στα κακοήδη κύτταρα, χωρίς απαραίτητα αυξημένη σύνδεση του DNA.

6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΛΕΚΤΙΝΩΝ PHV, UEA, PNA ΚΑΙ WGA ΣΕ ΑΔΕΝΩΜΑΤΑ^{10,11}

Πρόκειται για ειδικές πρωτεΐνες με ικανότητα αναγνώρισης συμπλεγμάτων υδρογονανδράκων και γλυκοπρωτεϊνών τα οποία κυρίως ανιχνεύονται πάνω στις κυτταρικές μεμβράνες κατά τη διάρκεια της εκτροπής των κυττάρων από τη φυσιολογική οδό πολλαπλασιασμού στην καρκινωμάτωση εξαλλαγή.

Προτεινόμενος **δετικός μάρτυρας**: τομές νεφρικού παρεγχύματος [άπω εσπειραμένα,

αδραιοτικά σωληνάρια και μαλπιγγιανά σωμάτια, ειδικότερα για τις λεκτίνες Peanut (PNA), Wheat Germ Agglutinin (WGA) και ενδοθήλια αγγείων για την Ulex Europaeus (UEA)].

- Η λεκτίνη PNA εμφανιζόταν συχνότερα σε επιδηλιακές αδρόσεις με χαρακτήρες ενδοεπιδηλιακού ή ενδοβλεννογονικού καρκινώματος.

- Η λεκτίνη Phaseolus vulgaris (PHV) εκφράστηκε περισσότερο σε δείγματα ασθενών μεγάλης ηλικίας ($p<0,01$), όπως εξάλλου και η UEA η οποία, επιπλέον, ήταν και η μόνη που συσχετίστηκε σε στατιστικώς σημαντικό βαθμό με την ύπαρξη σοβαρού βαθμού δυσπλασίας ($p<0,05$). Οι δετικοί στη λεκτίνη UEA πολύποδες χαρακτηρίζονται κατά το πλείστον από υψηλά ποσοστά ανοσοϊστοδοδετικότητας για το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζομένων κυττάρων (PCNA).

Κατά τη διάρκεια του νεοπλασματικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της εκτροπής των επιδηλιακών κυττάρων προς κακοήθεια μεταβάλλεται η σύνδεση των γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής τους μεμβράνης κι έτσι εμφανίζονται ευκολότερα τμήματα σακκάρων επ' αυτής στα οποία προσκολλώνται οι αντίστοιχες λεκτίνες. Η ανίχνευση υψηλών ποσοστών PCNA και η ταυτόχρονη πρόσληψη της λεκτίνης UEA μπορεί να αποτελέσουν αξιοπρόσεκτο δείκτη δυνητικής εκτροπής προς κακοήθεια. Η λεκτίνη PNA μπορεί να εμπλέκεται στη φάση της διηθητικής δραστηριότητας των επιδηλιακών κυττάρων.

7. ΔΕΙΚΤΕΣ ΑΝΟΣΟΕΠΙΤΗΡΗΣΗΣ^{12,13}

Η παρουσία των αντιγόνων HLA-DR είναι συνυφασμένη με την αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα διαφόρων κυτταρικών πληθυσμών και οδηγεί στην ενεργοποίηση των T_4 λεμφοκυττάρων προς έκκριση λεμφοκινών οι οποίες δυνητικώς δραστηριοποιούν κάθε λογής ανοσοαρμόδιο κύτταρο.

Προτεινόμενος **δετικός μάρτυρας** για τα μόρια HLA-DR: τομές αμυγδαλής. Προτεινόμενος **αρνητικός μάρτυρας** για τα μόρια HLA-DR: φυσιολογικό επιδήλιο παχέος εντέρου (χωρίς όμως παρουσία λεμφικού ιστού και άρα χωρίς κύτταρα M πάνω από μονήρη λεμφοζίδια).

- Έκφραση των παραγόντων HLA-DR αναδείχθηκε σε καρκινικά και σε στρωματικά ("εξ επαγγέλματος" αντιγονοπαρουσιαστικά) κύττα-

ρα στο 74,2% των μελετηθέντων καρκινωμάτων με ανάλογα αυξημένη ποσοτική διακύμανση των T₄ λεμφοκυττάρων και καλύτερη επιβίωση των εν λόγω ασθενών (p<0,01).

• Οι μεταστατικώς διηθημένοι επιχώριοι λεμφαδένες χαρακτηρίστηκαν από σαφώς μειωμένη παρουσία των HLA-DR μορίων, ενώ οι ασθενείς σταδίου C στους αρνητικούς για μετάσταση λεμφαδένες των οποίων παρατηρήθηκε αυξημένη παρουσία των HLA-DR μορίων παρουσίασαν καλύτερη κλινική πορεία και επιβίωση σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς του αυτού σταδίου (p<0,01).

Η απλή ποσοτική εκτίμηση της παρουσίας των T₄ λεμφοκυττάρων δεν αντικατοπτρίζει το ιστικό επίπεδο ανοσοεπιτήρησης του καρκινοπαδούς. Η ταυτόχρονη συνεκτίμηση της έκφρασης των αντιγόνων HLA-DR σε κύτταρα που μπορούν να δράσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά υποδηλώνει τη δυνατότητα δραστηριοποίησης των T₄ κυττάρων στην έναρξη ανοσιακής απάντησης.

8. ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΟΡΜΟΝΟΕΞΑΡΤΗΣΗΣ

Υπάρχουν ενδείξεις ότι υποδοχείς στεροειδών ορμονών εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα οργάνων που δεν θεωρούνται στόχοι των ορμονών του φύλου. Από την άλλη πλευρά, σε καρκινώματα μαστού με δετικούς ορμονοϋποδοχείς η έκφραση του οιστρογονοεξαρτώμενου γονιδίου pS2¹⁴ έχει συσχετισθεί με ευμενή εξέλιξη τους λόγω λειτουργικής στεροειδικής ανταπόκρισης.

Βιβλιογραφικώς, αναφέρεται αμιγώς κυτταροπλασματική ανοσοϊστοθετικότητα των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου στο αντιγόνο ER-D5 που απαντάται αποκλειστικά σε ιστούς διαθέτοντες οιστρογονικούς υποδοχείς¹⁵. Έχει επίσης καταστεί δυνατή η ανάδειξη πυρηνικών οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων (ERs και PRs, αντίστοιχα) σε ορισμένο αριθμό αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου, αν και σε μικρότατα ποσοστά κακοήδων κυττάρων, με χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος H2225P psi σε τομές ψυκτικού¹⁶. Σε τομές παραφίνης, δοκιμάσαμε, με ανάλογα αποτελέσματα, συγκεκριμένα, ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα [κλώνων 1D5 (Dako) για τους ERs και PgR (Abbotts) για τους PRs] με υπερδερμική προεργασία των τομών υπό πίεση για 1'-2' σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου

0,01 M (pH6,0), μετέπειτα διπλό ξέπλυμα των κρύων (αλλά όχι στεγνών) τομών σε διάλυμα PBS και συνέχιση με τις συνήδεις ανοσοϊστοχημικές επωάσεις.

Θετικοί μάρτυρες: τομές ενδομητρίου γυναίκας αναπαραγωγικής ηλικίας ή τομές καρκινώματος μαστού με βιοχημικώς διαπιστωμένα υψηλά επίπεδα ορμονοϋποδοχέων.

• Σπάνια, πυρηνική έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων εντοπίσθηκε στο 33,8% των καρκινωμάτων.

• Προγεστερονικοί υποδοχείς αναδείχθηκαν, επίσης όλως εστιακώς, στο 30,5% των όγκων, συχνότερα σε γυναίκες ασθενείς (p<0,025), σε όγκους σταδίου B (p<0,01) και σε όγκους μέσης διαφοροποίησης (p<0,005).

• Η πρωτεΐνη pS2 εκφράστηκε στο 25% των περιπτώσεων, με ευρεία διακύμανση του ποσοστού ανοσοϊστοθετικών κακοήδων κυττάρων. Οι όγκοι που επέδειξαν ανοσοϊστοθετικότητα για την πρωτεΐνη pS2 είχαν σχετικά καλή διαφοροποίηση (Grades I και II) (p<0,05) και συχνή παραγωγή εξωκυττάριας βλέννης.

• Η πρωτοπλασματική ανοσοϊστοθετικότητα για την έκφραση του γονιδίου pS2 συνέπιπτε με αντίστοιχη τάση δετικής έκφρασης οιστρογονικών (p<0,10) και κυρίως προγεστερονικών υποδοχέων (p<0,001).

Συμπερασματικώς, επιτύχαμε την ανάδειξη υποδοχέων των ορμονών του φύλου σε επαρκή μεν αριθμό καρκινωμάτων του παχέος εντέρου, αλλά σε ελάχιστα ποσοστά καρκινοπαθών κυττάρων κάθε όγκου. Στις περιπτώσεις αυτές η παρουσία του πεπτιδίου pS2 είναι εκείνη που ίσως αντικατοπτρίζει λειτουργικό μηχανισμό δράσης στεροειδών ορμονών καθώς επίσης και υψηλή οργάνωση κυτταρικής φυσιολογίας των καρκινικών κυττάρων¹⁷.

9. Η ΚΑΘΕΨΙΝΗ D¹⁸

Πρόκειται για μια λυσοσωμιακή πρωτεάση η οποία έχει μελετηθεί κυρίως στον καρκίνο του μαστού όπου η σύνδεσή της υπόκειται σε οιστρογονική ρύθμιση. Θεωρείται ότι επιδρά στη διάσπαση του εξωκυττάρου διαμέσου ιστού από τα κακοήδη κύτταρα.

Προτεινόμενος δετικός μάρτυρας: τομές καρκινώματος μαστού από άρρωστη με ταυτόχρονα αυξημένα ορολογικά επίπεδα του ενζύμου.

• Η καθεψίνη D ανιχνεύθηκε στα καρκινικά κύτταρα στο 41,6% των όγκων και στα στρωματικά μακροφάγα στο 68,3% των εξετασθέντων.

των δειγμάτων.

- Παρατηρήθηκε αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ανοσοϊστοδοθετικότητας στα στρωματικά στοιχεία όγκων προχωρημένων σταδίων (κατά Dukes C και D) σε σχέση με εκείνα όγκων αρχικών σταδίων.

Οι όγκοι με αρνητική έκφραση της καδεψίνης D στα καρκινικά κύτταρα και ταυτόχρονη θετική έκφραση του ενζύμου στα στρωματικά κύτταρα συνοδεύτηκαν από φτωχή πρόγνωση ($p < 0,01$). Τα θετικά για το εν λόγω ένζυμο στρωματικά κύτταρα φαίνεται πως συμβάλλουν στη διηθητική ανάπτυξη και κακή εξέλιξη των αντιστοίχων καρκινωμάτων.

10. Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΘΕΡΜΟΠΛΗΞΙΑΣ HSP70^{12,13,19}

Η HSP70 συντίθεται σε κύτταρα που υφίστανται ποικίλης παθογένεσης βιολογική καταπόνηση και τα προστατεύει από περαιτέρω ζημιογόνες επιδράσεις. Η τοξική δράση ορισμένων χημειοθεραπευτικών (π.χ. αδριαμυκίνη) φαίνεται, μερικώς τουλάχιστον, να σχετίζεται με αναστολή της σύνδεσης διαφόρου MB ομάδων πρωτεϊνών δερμοπληξίας. Επίσης οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν με στεροειδικούς υποδοχείς ρυθμίζοντας τη δραστηριότητά τους.

Προτεινόμενος θετικός μάρτυρας: Τομές δέρματος με ηλιοδερματίτιδα.

Προτεινόμενος αρνητικός μάρτυρας: Τομές φυσιολογικού δέρματος από περιοχές μη εκτιθέμενες στην ηλιακή ακτινοβολία.

- Η HSP70 ανιχνεύθηκε στο 77% των μελετηθέντων καρκίνων, η δε αυξημένη παρουσία της συνόδευε χαμηλής διαφοροποίησης όγκους ($p < 0,05$) και φτωχή πρόγνωση ($p < 0,05$), ιδιαίτερα όταν συνδυαζόταν με απουσία HLA-DR αντιγόνων ($p < 0,001$). Ο δείκτης εκφράστηκε και σε φλεγμονώδη κύτταρα του στρώματος, γεγονός που ενισχύει τη σημασία του στην αλληλεπίδραση των νεοπλασματικών με τα κύτταρα της ανοσιακής αντίδρασης.

- Ειδικότερα στους όγκους εκείνους που επέδειξαν θετικούς προγεστερονικούς υποδοχείς, παρατηρήσαμε ότι η έκφραση της πρωτεΐνης pS2 συμβάδιζε ανάλογα με εκείνη της HSP70 ($p < 0,001$). Έτσι, η συνέκφραση HSP70 και pS2 δεν αποκλείεται να εμπλέκεται στη διατήρηση των προγεστερονικών υποδοχέων σε βιολογικώς ενεργό μορφή ή, εάν ληφθεί υπόψη η σπανιότητα των τελευταίων, φαίνεται απλά

πως υποδηλώνει τη συσχέτιση μεταξύ των οδών δραστηριοποίησης με τις οποίες τα κύτταρα απαντούν στην καταπόνηση και στις στεροειδείς ορμόνες.

Η δυσμενής προγνωστική αξία της HSP70 σχετίζεται με την αυξημένη βιολογική καταπόνηση που υφίστανται τα κύτταρα που την εκφράζουν καθώς και με πιθανή ανασταλτική επίδραση στην ανοσοαπάντηση του ξενιστή οργανισμού στα κακοήδη κύτταρα.

11. ΤΟ “ΜΗ-ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ” ΓΟΝΙΔΙΟ NM23²⁰

Η οικογένεια των στενά σχετιζομένων “μη-μεταστατικών” γονιδίων nm23 περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο ισοτύπους στον ανθρωπινό οργανισμό, τον H1 και τον H2. Η κατασταλτική ρύθμιση της έκφρασης του πρώτου ισοτύπου υπεισέρχεται στην εξάπλωση ορισμένων κακοήδων νεοπλασιών. Το γονίδιο nm23-H1 κωδικοποιεί την NDP-κινάση A, μια μεταφοράση η οποία, συμμετέχοντας στην οργάνωση και αποδιοργάνωση των μικροσωληναρίων του κυτταροσκελετού, δυνητικώς επηρεάζει την ικανότητα των κυττάρων να κινούνται και να προσκολλώνται, συνεισφέροντας έτσι στο μεταστατικό δυναμικό των κακοήδων κυττάρων.

- Η έκφραση του προϊόντος του ισοτύπου H1 του γονιδίου nm23 (κινάση NDP-A) παρατηρήθηκε στο 51,5% των καρκινωμάτων και συμβάδιζε με αυξημένο βάθος διήθησης του εντερικού τοιχώματος (στάδια B₂ και C₂ κατά Astler-Coller) ($p < 0,025$), αλλά ταυτόχρονα με τάση απουσίας επιχωρίων λεμφαδενικών μεταστάσεων (στάδια A και B κατά Dukes) ($p < 0,10$).

- Οι όγκοι που εξέφραζαν την πρωτεΐνη nm23-H1 ως επί το πλείστον χαρακτηρίζονταν από αυξημένη έκφραση του PCNA ($p < 0,001$).

Η ανίχνευση του πεπτιδίου του γονιδίου nm23-H1 σχετίζεται θετικά με την επέκταση των καρκινωμάτων, αλλά μόνο στο τοπικό επίπεδο της πρωτοπαθούς εστίας. Η έκφραση του nm23-H1, από μόνη της, δεν προδικάζει απουσία μεταστατικής ικανότητας. Στην τελευταία εμπλέκεται πιθανώς η δράση ενός ξεχωριστού γονιδίου που συνδέεται ή γειτονεύει με το nm23H1, καθώς και ένας ξεχωριστός από την NDP-κινάση τρόπος βιοχημικής δράσης. Πάντως, η δράση της NDP-κινάσης, καθώς αυτή συναπομονώνεται με την ριβονουκλεοτιδική αναγωγή, μπορεί να συμμετέχει στη σύνδεση του DNA, εξ ου και η συσχέτιση με ικανό αριθμό

κυτταρικού αναδιπλασιασμού στα εξετασθέντα καρκινώματα.

SUMMARY

Immunohistochemical markers in sporadic colorectal neoplasia

A.Ch. Lazaris, P.S. Davaris

Department of Pathology, Medical School of Athens University

Important research perspectives are opened by the identification of functional markers that play a causative role in the development and progression of human colorectal cancer and which are targets or able to favour the activity of anticancer agents. Among the putative prognostic markers recently proposed, considerable attention has been received by the synchronous expression of more than one gene products. In this article, we review a panel of immunohistochemical markers the prognostic value of which was evaluated in patients with colorectal neoplasms.

Key words: *immunohistochemistry, colorectal neoplasia, prognosis*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ντελλή Θ, Λάζαρης ΑΧ, Θεοδωρόπουλος ΓΕ, Ντελλής Ν, Χατζηγιάννη Ε, Κούλλιας Γ και συν. Συγκριτική ορολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου σε αδενοκαρκινώματα του πεπτικού συστήματος. Πρακτικά ΧΙΧ Πανελληνίου Συνεδρίου Χειρουργικής, Θεσσαλονίκη, 1994:166-167.
2. Θεοδωρόπουλος ΓΕ, Πανουσόπουλος Δ, Λάζαρης ΑΧ, Τσελένη-Μπαλαφούτα Σ, Δάβαρης ΠΣ, Γολεμάτης ΒΧ. Κλινική σημασία και ιστική μελέτη του επιδηλιακού πολυπεπτιδιακού αντιγόνου ΤΡΑ σε καρκινώματα του στομάχου και του παχέος εντέρου. Ελληνική Χειρουργική, Acta Chirurgica Hellenica, 66:360-365, 1994.
3. Kinzler KW, Vogelstein B. Colorectal tumors. In: Vogelstein B and Kinzler KW (eds) The Genetic Basis of Human Cancer. McGraw-Hill, New York, 1998:565-587.
4. Δάβαρης Π, Χατζηγιάννη ΕΒ, Λάζαρης ΑΧ, Κούλλιας Γ, Θεοδωρόπουλος ΓΕ, Πετράκη Κ και συν. Η σημασία της ανίχνευσης του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF-R) στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου. "Ίπποκράτης" Έκδοση της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών, 2: 46-52, 1994.
5. Nikiteas N, Glinatsis M, Dimopoulos Ch, Lazaris A, Pougouras I, Davaris P et al. p53 and c-erbB-2 mutations in colorectal cancer; are they of any predictive value? International Proceedings of the 5th Congress of the European Council for Coloproctology 1995:171-175.
6. Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Anastassopoulos P, Nakopoulou L, Panoussopoulos D, Padimitriou K. Prognostic significance of p53 and c-erbB-2 immunohistochemical evaluation in colorectal adenocarcinoma. Histol Histopathol 10(3):661-668, 1995.
7. Jernvall P, Makinen M, Karttunen T, Makela J, Vihko P. Conserved region mutations of the p53 gene are concentrated in distal colorectal cancers. Int J Cancer 74:97-101, 1997.
8. Lazaris AC, Davaris P, Nakopoulou L, Theodoropoulos GE, Koullias GJ, Golematis BC. Correlation between immunohistochemical expression of proliferating cell nuclear antigen and flow cytometry parameters in colorectal neoplasia. Dis Colon Rectum 37(1):1083-1089, 1994.
9. Λάζαρης ΑΧ, Χατζηγιάννη ΕΒ, Αναστασόπουλος ΠΔ, Κουνέλη Σ, Βαράτσος Α, Δάβαρης ΠΣ. Έκφραση του πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων PCNA και πλοειδικότητα του DNA στα αδενώματα του παχέος εντέρου. Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής 9(3):140-146, 1995.
10. Ryder SD, Parker N, Ecclestone D, Haggani MT, Rhodes J. Peanut lectin stimulates proliferation in colonic explants from patients with inflammatory bowel disease and colon polyps. Gastroenterology 106:117-124, 1994.
11. Ryder SD, Smith JA, Rhodes EG, Parker N, Rhodes JM. Proliferative responses of HT29 and Caco2 human colorectal cancer cells to a panel of lectins. Gastroenterology 106:85-93, 1994.
12. Anastassopoulos PD, Lazaris AC, Patsanas TM, Chatzigianni ΕΒ, Diamandopoulos Α, Lithoxopoulou MI et al. Tissue evaluation of immune surveillance in colorectal cancer. Inter-

- national Proceedings of the First Balkan Congress of Oncology, 1996:619-622.
13. Lazaris AC, Theodoropoulos GE, Davaris PS, Panoussopoulos D, Nakopoulou L, Kittas C et al. Heat shock protein 70 and HLA-DR molecules tissue expression. Prognostic implications in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 38(7):739-745, 1995.
 14. Mori K, Fujii R, Kida N, Takahashi H, Ohkubo S, Fujino M et al. Complete primary structure of the human estrogen-responsive gene (pS2) product. *J Biochem* 107:73-76, 1990.
 15. Takeda H, Yamakawa M, Takahashi T, Imai Y, Ishikawa M. An immunohistochemical study with an estrogen receptor-related protein (ER-DS) in human colorectal cancer. *Cancer* 69(4):907-912, 1992.
 16. Cameron BL, Butler JA, Rutgers J, Vargas HI, Purtell M, Sheppard B. Immunohistochemical determination of the estrogen receptor content of gastrointestinal adenocarcinomas. *Am Surg* 58(12):758-760, 1992.
 17. Rio MC, Bellocq JP, Daniel JY, Tomasetto C, Lathe R, Chenard MP et al. Breast cancer associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science* 241:705-706, 1988.
 18. Θεοδωρόπουλος ΓΕ, Πανουσόπουλος Δ, Λάζαρης ΑΧ, Χατζηγιάννη Ε, Δάβαρης ΠΣ, Γολεμάτης ΒΧ. Ιστοική μελέτη της καδεψίνης D στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου. Πρακτικά XIX Πανελληνίου Συνεδρίου Χειρουργικής. Θεσσαλονίκη, 1994:164-165.
 19. Λάζαρης ΑΧ, Χατζηγιάννη ΕΒ, Θεοδωρόπουλος ΓΕ, Βαράτσος Α, Αναστασόπουλος Π, Σαέττα Α και συν. Πρωτεΐνες του stress HSP-70. Ο ρόλος τους στα αδενοκαρκινώματα στομάχου και παχέος εντέρου. *Ιατρική* 69(4):395-401, 1996.
 20. Tannapfel A, Kockerling F, Katalinic A, Wittekind C. Expression of nm23-H1 predicts lymph node involvement in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 39(6):651-654, 1995.