

## Ανοσοϊστοχημική μελέτη της πρωτεΐνης pS2 σε καρκινώματα και φυσιολογικό βλεννογόνο στομάχου

A. Κομηνέα<sup>1</sup>, N. Καπράνος<sup>1</sup>, Γ. Βανδώρος<sup>1</sup>, E. Κόκκα<sup>2</sup>, Γ. Σωτηροπούλου<sup>3</sup>

Στην εργασία αυτή μελετήσαμε ανοσοϊστοχημικά την έκφραση της πρωτεΐνης pS2 σε καρκινώματα στομάχου και φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο εγγύς του όγκου. Το υλικό της μελέτης αποτελείτο από 90 καρκινώματα στομάχου χειρουργικά εξαιρεθέντα με ολική ή υφολική γαστρεκτομή από 48 άνδρες και 42 γυναίκες ηλικίας 37-86 ετών (μέση ηλικία 64,5 έτη). Η ανοσοϊστοχημική χρώση της πρωτεΐνης pS2 αξιολογήθηκε με ιστολογικό σύστημα διαβάθμισης (H-score) από 0 έως 12 βαθμούς. Κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική χρώση παρατηρήθηκε σε 55 περιπτώσεις (61%) καρκινώματος και σε όλες τις περιπτώσεις φυσιολογικού γαστρικού βλεννογόνου. Στον τελευταίο η ανοσοϊστοχημική χρώση εντοπιζέτο στο αδενικό επιθήλιο της επιφανείας και των δύο άνω τριτημορίων των κρυπτών, καθώς και στις εκκρίσεις εντός αυτών, ενώ στο κάτω τριτημόριο και στους εν τω βάθει αδένες η ανοσοϊστοχημική χρώση του επιθηλίου ήταν ασθενής ή αρνητική. Σε περιοχές δυσπλασίας ή εντερικής μετάπλασης παρατηρήθηκε ασθενέστερη ή αρνητική ανοσοϊστοχημική χρώση του επιθηλίου. Στα καρκινώματα η θετική χρώση αφορούσε τα 26 από τα 45 (57,8%) εντερικού, τα 13 από τα 25 (52%) διάχυτου, τα 12 από τα 13 (92,3%) μικτού και τα 4 από τα 7 (57,2%) βλεννώδους τύπου. Υψηλότερος βαθμός ανοσοϊστοχημικής χρώσης, στατιστικά σημαντικός, παρατηρήθηκε στα καρκινώματα σταδίου III και σε καρκινώματα με μεταστάσεις σε περισσότερους από 3 λεμφαδένες ( $P=0,05$ ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική σχέση της έκφρασης της πρωτεΐνης pS2 με το φύλο και την ηλικία των ασθενών, τον ιστολογικό τύπο, το βαθμό διαφοροποίησης, το μέγεθος και την εντόπιση του όγκου.

Συμπερασματικά τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι η πρωτεΐνη pS2 παρουσιάζει σταθερή έκφραση στο φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο με συγκεκριμένη κατανομή, η οποία φαίνεται ότι σχετίζεται λειτουργικά με την προστασία της ακεραιότητας και την αναγέννηση του βλεννογόνου και ότι η υψηλότερου βαθμού έκφραση της πρωτεΐνης pS2 στα καρκινώματα του στομάχου πιθανόν να αποτελεί δείκτη επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς.

**Λέξεις κλειδιά:** Καρκίνωμα στομάχου, pS2, ανοσοϊστοχημεία

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πρωτεΐνη pS2 είναι μέλος της οικογένειας πολυπεπτιδίων που χαρακτηρίζεται δομικά από επαναλαμβανόμενους δισουλφιδικούς δεσμούς (trefoil peptides) και έχει μοριακό βάρος 6,45 kDa. Το γονίδιο pS2 κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά από την κυτταρική σειρά καρκινώματος μαστού MCF-7, η οποία ευρίσκεται κάτω από τη ρυθμιστική δράση οιστρογόνων<sup>1</sup>. Η επαγωγή του mRNA και της πρωτεΐνης pS2 από τη δράση των οιστρογόνων επιβεβαιώθηκε από τις περισσότερες μελέτες σε καρκινώματα μαστού οι οποίες περιέγραψαν δετική σχέση της πρωτεΐνης με τους οιστρογονικούς υποδοχείς<sup>2,3</sup>, την ανταπόκριση στην ορμονική θεραπεία<sup>4</sup> και την καλύτερη πρόγνωση<sup>5,6</sup>. Επιπροσθέτως σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι το γονίδιο pS2 ρυθμίζεται και από τα προϊόντα των ογκογονιδίων *c-jun*, *c-Ha-ras* και από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα και ότι πιθανόν η πρωτεΐνη pS2 να έχει δράση αυξητικού παράγοντα<sup>7,8</sup>.

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε ανδρώπινους ιστούς έδειξαν ότι η πρωτεΐνη pS2 εκφράζεται στο αδενικό επιθήλιο του μαστού<sup>9</sup>, του βλεννογόνου του στομάχου και ασθενώς στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου και των σιελογόνων αδένων<sup>10</sup>. Αντίθετα δεν παρατηρήθηκε ουσιώδης ανοσοϊστοχημική χρώση στο επιθήλιο του βλεννογόνου παχέος εντέρου, οισοφάγου, χοληδόχου κύστεως και ενδομητρίου, καθώς και στο πάγκρεας, θυρεοειδή, παραθυρεοειδείς αδένες, πνεύμονα, προστάτη, ουροδόχο κύστη, νεφρούς, επινεφρίδια, λεμφαδένες, όρχεις, ωοθήκες, πλακούντια, υπόφυση, εγκέφαλο και δέρμα<sup>11</sup>. Σε κακοήδεις όγκους ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης pS2 έχει περιγραφεί εκτός από τα καρκινώματα μαστού, σε αδενοκαρκινώματα διαφόρων οργάνων όπως του παγκρέατος, του παχέος εντέρου, ωοθηκών και ενδομητρίου και σπανιότερα σε καρκινώματα προστάτου, ουροδόχου κύστεως, τραχήλου μήτρας και πνεύμονα<sup>12</sup>.

Όσον αφορά το καρκίνωμα του στομάχου έχουν δημοσιευθεί λίγες μελέτες της έκφρασης της πρωτεΐνης pS2 σε σχέση με διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και την πρόγνωση<sup>13-18</sup> χωρίς όμως να διευκρινίσουν πλήρως τη σημασία της. Ο σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν να μελετήσουμε ανοσοϊστοχημικά την έκφραση της πρωτεΐνης pS2 σε φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο και καρκινώματα στομάχου σε Έλληνες ασθενείς και

να διερευνήσουμε τη σχέση της με κλινικά και παθολογοανατομικά δεδομένα που αφορούν τη βιολογική συμπεριφορά των όγκων.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το υλικό της μελέτης αποτελείται από 90 καρκινώματα στομάχου χειρουργικώς εξαιρεθέντα με ολική ή υπολική γαστρεκτομή από 48 άνδρες και 42 γυναίκες ηλικίας 37-86 ετών (μέση ηλικία 64,5). Από κάθε περίπτωση ελήφθησαν αντιπροσωπευτικές τομές από τον όγκο και τον παρακείμενο γαστρικό βλεννογόνο, οι οποίες μονιμοποιήθηκαν σε ουδέτερη φορμόλη και εγκλείσθηκαν σε παραφίνη. Τα κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των όγκων αναφέρονται αναλυτικά στον πίνακα 1.

### Ανοσοϊστοχημική μέθοδος

Τομές παραφίνης όγκων και φυσιολογικού βλεννογόνου στομάχου, πάχους 4 μm τοποθετήθηκαν σε πλακίδια επεξεργασμένα με οργανοσιλάνιο και παρέμειναν για όλη τη νύκτα σε κλίβανο θερμοκρασίας 45° C. Μετά από αποπαραφίνωση και ενυδάτωση οι τομές τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 1,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε απεσταγμένο νερό για την ανάλωση της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Οι τομές εκπλύθηκαν ακολούθως σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS) για 3X5 λ και επώασθηκαν με φυσιολογικό ορό αλόγου σε PBS για τη δέσμευση των μη-ειδικών αντιγονικών δέσεων. Οι τομές επώασθηκαν ακολούθως για όλη τη νύκτα σε θερμοκρασία 4° C με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης pS2 (κλώνος pS2.1, Biogenex, San Ramon, CA), σε αραιώση 1:80 σε PBS. Οι τομές εκπλύθηκαν σε διάλυμα PBS και ακολούθως επώασθηκαν με βιοτινυλιωμένο αντίσωμα έναντι του Fc τμήματος των ανοσοσφαιρινών του ποντικού, σε αραιώση 1:200 σε PBS για 40 λ σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από ξέπλυμα σε PBS, οι τομές επώασθηκαν με διάλυμα συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (ABC Elite Vectastain, Vector, Burlingame, USA) για 40 λ σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση της δετικής ανοσοαντίδρασης έγινε με τοποθέτηση των τομών σε διάλυμα 3',3' τετραϊδροχλωρικής διαμινοβενζιδίνης (0,6 mg/ml σε TBS pH 7,6 και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03%) και ακολούθησε μετάχρωση των πυρήνων με αιμοτοξιλίνη Harris, αφυδάτωση, διαύγαση και επικάλυψη των

**Πίνακας 1.** Κλινικά και παθολογοανατομικά δεδομένα των περιπτώσεων καρκινωμάτων στομάχου, σε σχέση με τη θετική ή αρνητική ανοσοαντίδραση για την πρωτεΐνη pS2.

	Συν.αρ.περ.(%)	pS2 - Αρ.περ.(%)	pS2+ Αρ.περ.(%)	P
<b>Φύλο</b>				0,5
Αρρεν	48 (53,3)	18 (37,5)	30 (62,5)	
Θήλυ	42 (46,7)	17 (40,5)	25 (59,5)	
<b>Ηλικία</b>				0,5
≤60	26 (29)	10 (38,5)	16 (61,5)	
>60	64 (71)	25 (39)	39 (61)	
<b>Μέγεθος όγκου</b>				0,10
≤5	49 (54,5)	16 (32,6)	33 (67,4)	
>5	41 (45,5)	19 (46,3)	22 (53,7)	
<b>Στάδιο</b>				0,4
I	4 (4,7)	2 (50)	2 (50)	
II	10 (11,8)	4 (40)	6 (60)	
III	70 (82,3)	26 (37)	44 (63)	
III	1 (1,2)	1 (100)	0 (0)	
<b>Ιστολ. τύπος</b>				0,3
Εντερικός	45 (50)	19 (42,2)	26 (57,8)	
Διάχυτος	25 (28)	12 (48)	13 (52)	
Μικτός	13 (14)	1 (7,7)	12 (92,3)	
Βλενωδής	7 (8)	3 (42,8)	4 (57,2)	
<b>Βαθμός Διαφοροποίησης</b>				0,55
I	16 (17,8)	6(37,5)	10 (62,5)	
II	25 (27,8)	11 (44)	14 (56)	
III	49 (54,4)	18 (36,7)	31 (63,3)	
<b>Μεταστάσεις σε λεμφαδένες</b>				0,05
≤3	36 (40)	18 (50)	18 (50)	
>3	54 (60)	17 (31)	37 (69)	
<b>Αγγειακή διήθηση</b>				0,5
Ναι	84 (93,3)	33 (39,3)	51 (60,7)	
Οχι	6 (6,7)	2 (33,3)	4 (66,7)	

τομών. Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστολογικές τομές καρκινώματος μαστού γνωστής θετικότητας σε pS2 και ως αρνητικοί μάρτυρες τομές καρκινώματος στομάχου στις οποίες επιτελέσθηκαν όλα τα στάδια της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, αλλά παραλήφθηκε η χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος.

### Αξιολόγηση ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Η αξιολόγηση της θετικής χρώσης έγινε με σύστημα ιστολογικής διαβάθμισης, που βασίζεται στο γινόμενο του ποσοστού των θετικών κυττάρων επί την ένταση της ανοσοχρώσης, μετά από μικροσκοπική εξέταση όλης της έκτασης της τομής. Το ποσοστό των θετικών κυττάρων ταξινομήθηκε σε 4 κατηγορίες: 1: 1-25%, 2: 26-50%, 3: 51-75%, και 4: >75%. Η ένταση

της χρώσης ταξινομήθηκε σε 3 κατηγορίες δηλαδή 1: ασθενής, 2: μέτρια και 3: έντονη. Ο συνολικός βαθμός της ανοσοϊστοχημικής χρώσης προέκυπτε από τον πολλαπλασιασμό του βαθμού του ποσοστού των θετικών κυττάρων με το βαθμό της έντασης της ανοσοαντίδρασης και κυμαίνεται από 1 έως 12.

### Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα και τα κλινικοπαθολογοανατομικά δεδομένα της μελέτης καταχωρήθηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και επεξεργάσθηκαν με τη βοήθεια στατιστικού προγράμματος (SPSS Inc, Chicago IL). Η συσχέτιση των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων με τις κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους των όγκων έγινε με τη δοκιμασία  $\chi^2$  (two-

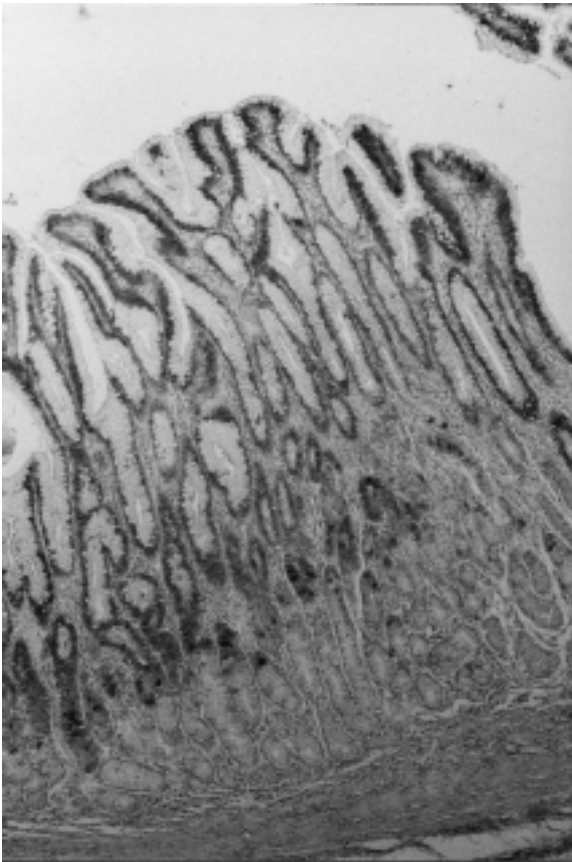
sided Fisher exact test) ενώ η ανάλυση των μέσων τιμών H-score με τη δοκιμασία t-test. Στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε κάθε τιμή P ίση ή μικρότερη από 0,05.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

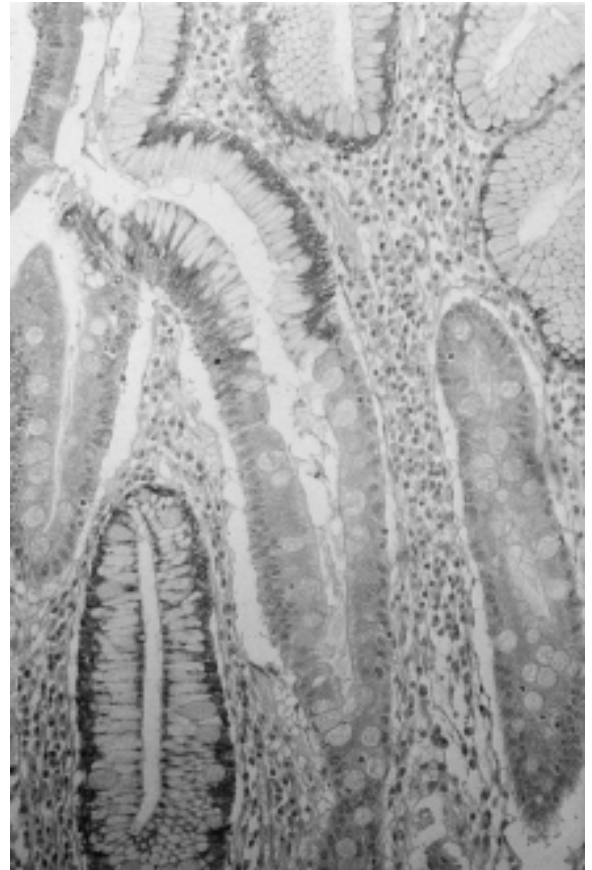
Στο φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη pS2 παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, στο αδενικό επιθήλιο της επιφανείας και των δύο άνω τριτημορίων των κρυπτών, καθώς και στις εκκρίσεις εντός αυτών, ενώ στο κάτω τριτημόριο και στους εν τω βάθει αδένες η ανοσοϊστοχημική χρώση του επιθηλίου ήταν ασθενής ή αρνητική (Εικ. 1). Η χρώση εντοπιζότο στην υποπυρηνική και περιπυρηνική περιοχή του κυτταροπλάσματος των αδενικών κυττάρων. Σε

περιοχές εντερικής μετάπλασης του γαστρικού βλεννογόνου, που συνυπήρχαν σε 8 περιπτώσεις καρκινωμάτων, παρατηρήθηκε λίαν ασθενής ή αρνητική ανοσοϊστοχημική χρώση (Εικ. 2). Επιδηλιακή δυσπλασία μετρίου ή/και σοβαρού βαθμού παρατηρήθηκε σε 12 περιπτώσεις εγγύς του όγκου. Τα δυσπλαστικά αδένια παρουσίαζαν μείωση της έντασης της χρώσης σε σχέση με το φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο, η οποία ήταν διάχυτη κυτταροπλασματική.

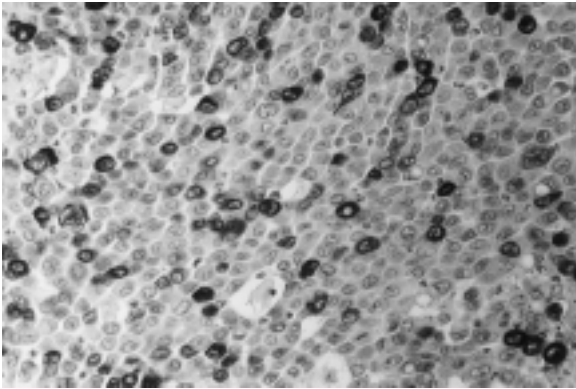
Τα 55 από τα 90 (61%) καρκινώματα στομάχου παρουσίαζαν διάχυτη κυτταροπλασματική ανοσοϊστοχημική χρώση για την πρωτεΐνη pS2, με περιπυρηνική ενίσχυση σε λίγα νεοπλασματικά κύτταρα (Εικ. 3). Στους περισσότερους όγκους παρατηρήθηκε ετερογένεια κατανομής όσον αφορά την ένταση και την



**Εικόνα 1.** Πρωτεΐνη pS2 σε φυσιολογικό γαστρικό βλεννογόνο. Η ανοσοϊστοχημική χρώση εντοπίζεται στο επιθήλιο της επιφανείας και των δύο άνω τριτημορίων των κρυπτών ενώ τα εν τω βάθει αδένια είναι αρνητικά (ABC-υπεροξειδάση, X8).

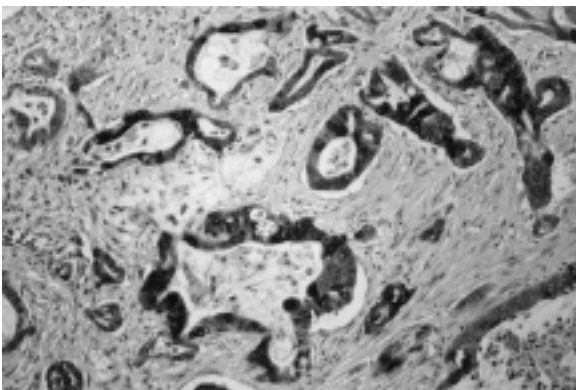


**Εικόνα 2.** Πρωτεΐνη pS2 σε περιοχή εντερικής μετάπλασης του γαστρικού βλεννογόνου. Η ανοσοϊστοχημική χρώση είναι λίαν ασθενής σε σχέση με αυτή του γειτονικού φυσιολογικού γαστρικού επιθηλίου. (ABC-υπεροξειδάση, X20).



**Εικόνα 3.** Χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα στομάχου μετά από ανοσοϊστοχημική χρώση για pS2. Τα περισσότερα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζουν κυτταροπλασματική χρώση με περιπτυρηνική ενίσχυση σε πολλά από αυτά (ABC-υπεροξειδάση, X40).

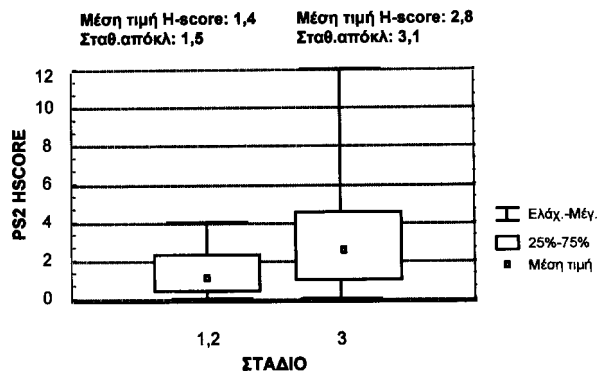
έκταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης (Εικ. 4). Στον πίνακα 1 φαίνεται η σχέση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης της πρωτεΐνης pS2 με το φύλο, την ηλικία, το μέγεθος, το στάδιο, τον ιστολογικό τύπο και το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου, τις λεμφαδενικές μεταστάσεις, και την παρουσία ή όχι αγγειακής διήθησης. Σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο των καρκινωμάτων παρατηρήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση στα 26 από τα 45 (57,8%) εντερικού τύπου, στα 13 από τα 25 (52%) διάχυτου τύπου, στα 12 από τα 13 (92,3%) μικτού τύπου και στα 4 από τα 7 (57,2%) βλεννώδους τύπου. Στατιστι-



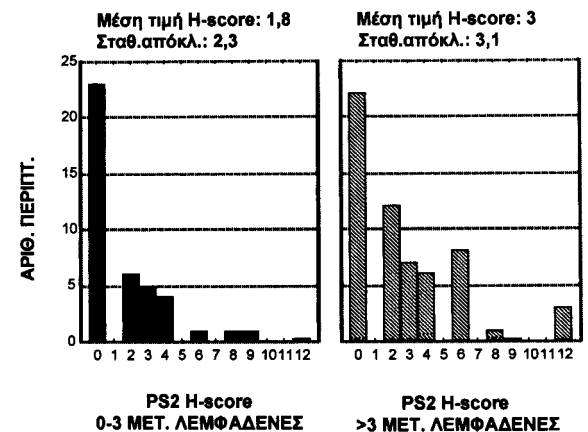
**Εικόνα 4.** Ανοσοϊστοχημική χρώση pS2 σε καλά διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα στομάχου. Παρατηρείται διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση των νεοπλασματικών κυττάρων με ετερογένεια όσον αφορά την ένταση (ABC-υπεροξειδάση, X20).

κά σημαντική διαφορά δετικότητας στην πρωτεΐνη pS2 παρατηρήθηκε μεταξύ όγκων με μεταστάσεις σε περισσότερους από 3 λεμφαδένες (69%) και όγκων με μεταστάσεις σε λιγότερους από 3 λεμφαδένες (50%) ( $P=0,05$ ).

Με βάση το ιστολογικό σύστημα διαβάδμισης της χρώσης (H-score) οι δετικές περιπτώσεις κυμαίνοντο από 2 έως 12 βαθμούς με μέση τιμή 2,5, διάμεση τιμή 2 και σταθερή απόκλιση 2,8. Σημαντικά μεγαλύτερη διαφορά H-score βρέθηκε σε καρκινώματα σταδίου 3 σε σχέση με τα καρκινώματα σταδίου 1 και 2 (Εικ. 5) και σε καρκινώματα με μεταστάσεις σε περισσότερους από 3 λεμφαδένες (Εικ. 6).



**Εικόνα 5.** H-score ανοσοϊστοχημικής χρώσης pS2 σε καρκινώματα στομάχου σταδίου 1,2 και 3 σε διαγραμματική απεικόνιση κατά Box & Whisker (t value=1,95) ( $P=0,05$ ).



**Εικόνα 6.** Ιστόγραμμα κατανομής H-score ανοσοϊστοχημικής χρώσης pS2 σε καρκινώματα με μεταστάσεις σε 0-3 και περισσότερους από 3 επιχώριους λεμφαδένες (t value=1,98) ( $P=0,05$ ).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ακριβής λειτουργία της πρωτεΐνης pS2 δεν έχει διευκρινισθεί, έχει όμως βρεθεί ότι η πρωτεΐνη αυτή παρουσιάζει ομολογία δομής με το παγκρεατικό σπασμολυτικό πολυπεπτίδιο, πεπτιδική ορμόνη του γαστρεντερικού συστήματος του χοίρου, και το αντίστοιχο ανθρώπινο σπασμολυτικό πολυπεπτίδιο. Τα πεπτίδια αυτά χαρακτηρίζονται δομικά από τυχαία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 3 δυσουλφιδικών δεσμών<sup>19</sup> και πιστεύεται ότι έχουν λειτουργική σημασία για διατήρηση της ακεραιότητας του γαστρικού βλεννογόνου. Ειδικότερα, θεωρείται ότι συμβάλλουν στην προστασία του επιφανειακού βλεννογόνου του στομάχου από την επίδραση του έντονα όξινου περιβάλλοντος, καθώς και στην αποκατάσταση του γαστρικού βλεννογόνου επί ελκωτικών διαταραχών<sup>10,18</sup>. Οι λειτουργίες αυτές είναι συμβατές με την εντόπιση της πρωτεΐνης pS2 στα βλεννογόνια κύτταρα και τις εκκρίσεις του επιφανειακού γαστρικού βλεννογόνου που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη καθώς και άλλων ανοσοϊστοχημικών ερευνητικών εργασιών<sup>10,14,18</sup>. Επιπροσθέτως η σύνδεση της πρωτεΐνης από τα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου έχει επιβεβαιωθεί και με την εντόπιση αντίστοιχου του mRNA<sup>11,13</sup>. Δεδομένου ότι η ανίχνευση οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων στο φυσιολογικό βλεννογόνο και το καρκίνωμα του στομάχου είναι σπάνια και κατά το πλείστον ασθενής, θεωρείται απίθανο η σύνδεση της πρωτεΐνης να εξαρτάται από την επίδραση των οιστρογόνων η/και της προγεστερόνης<sup>17,18</sup>. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από πειραματικές μελέτες ανάλυσης της αλληλουχίας ελέγχου της μεταγραφής του γονιδίου pS2, στις οποίες βρέθηκε ότι η περιοχή αυτή δεν ανταποκρίνεται μόνο στα οιστρογόνα αλλά και σε άλλους παράγοντες όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας και οι πρωτεΐνες των ογκογονιδίων *c-jun* και *c-Ha-ras*<sup>8</sup>.

Αν και στο αδενικό επιθήλιο του φυσιολογικού γαστρικού βλεννογόνου η πρωτεΐνη pS2 ανιχνεύθηκε σε όλες τις μελετηθείσες περιπτώσεις, στα καρκινώματα παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης σε ποσοστό 61% και στα περισσότερα από αυτά, καθώς και στις δυσπλασίες, με μικρότερου βαθμού ένταση χρώσης σε σχέση με το φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο. Τα ευρήματα αυτά έχουν περιγραφεί και από άλλους συγγραφείς τόσο ανοσοϊστο-

χημικά<sup>14</sup> όσο και με ανάλυση του mRNA<sup>13,18</sup> και δείχνουν ότι η διαδικασία της καρκινογένεσης του στομάχου συνοδεύεται από ελάττωση της μεταγραφής του γονιδίου pS2.

Στην παρούσα μελέτη, με βάση τη θετικότητα ή μη στην έκφραση της πρωτεΐνης pS2, βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P=0,05$ ) στα καρκινώματα που είχαν μεταστάσεις σε περισσότερους από 3 επιχώριους λεμφαδένες (69% θετικές περιπτώσεις) σε σχέση με αυτά που είχαν λιγότερους από 3 μεταστατικούς λεμφαδένες (50% θετικές περιπτώσεις). Επιπροσθέτως, η ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση το ιστολογικό σύστημα διαβάθμισης της ανοσοϊστοχημικής χρώσης (H-score), έδειξε στατιστικά υψηλότερη μέση τιμή H-score σε καρκινώματα σταδίου 3 συγκριτικά με καρκινώματα σταδίου 1 και 2 (2,8 έναντι 1,4) ( $P=0,05$ ), καθώς και σε καρκινώματα με μεταστάσεις σε περισσότερους από 3 λεμφαδένες σε σχέση με καρκινώματα με λιγότερους από 3 μεταστατικούς λεμφαδένες (3 έναντι 1,8) ( $P=0,05$ ).

Τα ανωτέρω ευρήματα υποδηλώνουν ότι η πρωτεΐνη pS2 πιθανόν να εκφράζεται σε υψηλότερο βαθμό σε καρκινώματα στομάχου με επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά. Παρόμοια σχέση μεταξύ της έκφρασης της πρωτεΐνης pS2 και των λεμφαδενικών μεταστάσεων περιέγραψαν και οι Machado και συν.<sup>16</sup> οι οποίοι την απέδωσαν στο μεγαλύτερο βαθμό ανοσοαντίδρασης των διάχυτων καρκινωμάτων, τα οποία κυρίως παρουσίαζαν λεμφαδενικές μεταστάσεις. Συχνότερη έκφραση της πρωτεΐνης pS2 στα διάχυτου τύπου καρκινώματα ανέφεραν και άλλοι συγγραφείς<sup>17</sup>, ενώ αντίθετα σε άλλη μελέτη<sup>14</sup>, καθώς και στην παρούσα δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ανοσοαντίδρασης στους διάφορους ιστολογικούς τύπους. Οι Chaubert και συν.<sup>17</sup> παρατήρησαν επίσης ότι τα καρκινώματα προχωρημένου σταδίου είχαν μεγαλύτερη έκφραση της πρωτεΐνης pS2 ανεξαρτήτως ιστολογικού τύπου. Αντίθετα, οι Müller και Borchard<sup>14</sup> δεν παρατήρησαν σημαντική σχέση μεταξύ της ανοσοαντίδρασης του pS2 και των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων των περιπτώσεων καρκινωμάτων που μελετήθηκαν. Απουσία σχέσης του mRNA του γονιδίου pS2 με κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους περιέγραψαν επίσης και οι Luqmani και συν.<sup>13</sup> Σε δύο μελέτες που έγινε συσχέτιση της έκφρασης της πρωτεΐνης pS2 με την επιβίωση των ασθενών<sup>4,16</sup>, δεν παρατηρήθηκε στατιστικός σημα-

ντική διαφορά.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα μας δείχνουν ότι η πρωτεΐνη pS2 στο φυσιολογικό γαστρικό επιθήλιο έχει σταθερή έκφραση με συγκεκριμένη κατανομή, η οποία προφανώς έχει σχέση με τη λειτουργία της. Τόσο σε προκαρκινικές αλλοιώσεις, όσο και στα καρκινώματα στομά-

χου η πρωτεΐνη pS2 παρουσιάζει ελαττωμένη έκφραση. Στα καρκινώματα του στομάχου η υψηλότερου βαθμού έκφραση της πρωτεΐνης pS2 φαίνεται να έχει προγνωστική σημασία, δεδομένου ότι σχετίζεται με σημαντικές παραμέτρους που υποδηλώνουν επιδετική βιολογική συμπεριφορά.

## SUMMARY

### *Immunohistochemical study of pS2 protein in gastric carcinoma and normal gastric mucosa.*

*Kominea A., Kapranos N., Vadoros G., Kokka E., Sotiropoulou G.*

*Departments of Pathology Aegion General Hospital, and Amalia Fleming Hospital, Melissia, Athens, Laboratory of Anatomy, Medical School, University of Patras.*

*The aim of the present study was to examine the expression of pS2 protein in gastric carcinomas and normal gastric mucosa. Ninety cases of gastric carcinoma surgically removed by total or partial gastrectomy from 48 males and 42 females, 37-86 years old, were included in this study. Detection of pS2 protein was performed immunohistochemically by the use of monoclonal antibody and the staining was scored by an Hstoscore system from 0 to 12 grades. Cytoplasmic immunostaining was detected in 55 cases (61%) of gastric carcinoma and in all examined cases of normal gastric mucosa near the tumors. In normal gastric mucosa the immunoreaction was localized in subnuclear and perinuclear region of the superficial epithelium and the upper two thirds of the foveolae, as well as in luminal secretions, whereas the deeper glands were negative. In the regions of epithelial dysplasia or intestinal metaplasia which were coexistent with the tumors, the staining was weaker than in normal epithelium or negative. In carcinomas the staining was positive in 26 out of 45 (57,8%) intestinal, 13 out of 25 (52%) diffuse, 12 out of 13 (92,3%) mixed and 4 out of 7(57,2%) mucinous type. Significantly higher H-score for pS2 protein was observed in carcinomas stage III and in those with more than 3 metastatic lymph nodes (P=0.05). There was no significant correlation of pS2 expression with clinical and pathological parameters such as patient age or sex, tumor grade, size and location.*

*In conclusion, our findings indicate that: a. pS2 protein has constant expression and distribution in the gastric epithelium which is probably related to its putative physiological role in the cell renewal of gastric mucosa, and b. high pS2 expression in gastric carcinomas may be related to more aggressive biological behavior.*

**Key words:** *Gastric carcinoma, pS2, immunohistochemistry*

## BΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 10: 7895-7903, 1982.
2. Rio MC, Bellocq JP, Gairard B, Rasmussen UB, Krust A, Koehl C, et al. Specific expression of the pS2 gene in subclasses of breast cancers in comparison with oncogene ERBB2. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9243-9247, 1987.
3. Skilton RA, Luqmani YA, McClelland RA, Coombes RC. Characterization of messenger

- RNA selectively expressed in human breast cancer. *Br J Cancer* 60: 168-175, 1989.
4. Henry JA, Nicholson S, Henessy C, Lennard TW, May FE, Westley BR. Expression of the estrogen regulated pNR-2 mRNA in human breast cancer: relation to estrogen receptor mRNA levels and response to tamoxifen therapy. *Br J Cancer* 61: 31-38, 1990.
  5. Foekens JA, Rio MC, Sequin P. Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res* 50: 3832-3837, 1990.
  6. Cappelletti V, Coradini D, Scanziani EE, Benini E, Silverstrini R, Di Fronzo G. Prognostic relevance of ps2 status in association with steroid receptor status and proliferative activity in node negative breast cancer. *Eur J Cancer* 1315-1318, 1992.
  7. Thim L. A new family of growth factor-like peptides. *FEBS Lett* 250: 85-90, 1989.
  8. Nunez AM, Berry M, Imler JL, Chambon P. The 5'-flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumor promoter (TPA), c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *EMBO J* 8: 823-829, 1989.
  9. Hähnel E, Robbins P, Hähnel R. Expression of the pS2 gene in normal breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 28: 295-297, 1993.
  10. Hanby AM, Poulson R, Singh S, Elia G, Jeffery RE, Wright NA. Spasmolytic polypeptide is a major antral peptide: distribution of the trefoil peptides human spasmolytic polypeptide and pS2 in the stomach. *Gastroenterology* 105: 1110-1116, 1993.
  11. 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: 705-708, 1988.
  12. Henry JA, Bennett MK, Piggott NH, Levett DL, May FEB, Westley BR. Expression of the pNR-2/pS2 protein in diverse human epithelial tumors. *Br J Cancer* 64: 677-682, 1991.
  13. Luqmani Y, Bennett C, Paterson I, Corbishley CM, Rio MC, Chambon P, et al. Expression of pS2 gene in normal, benign and neoplastic human stomach. *Int J Cancer* 44: 806-812, 1989.
  14. Müller W, Borchard F. pS2 protein in gastric carcinoma and normal gastric mucosa: association with clinicopathological parameters and patient survival. *J Pathol* 171: 263-269, 1993.
  15. Theisinger B, Welter C, Seitz G, Rio MC, Lathe R, Chambon P, et al. Expression of the breast associated gene pS2 and the pancreatic spasmolytic polypeptide gene (hSP) in diffuse type of stomach carcinoma. *Eur J Cancer* 27: 770-773, 1991.
  16. Machado JC, Carneiro F, Ribeiro P, Blin N, Sobrinho-Simoes M. pS2 protein expression in gastric carcinoma. An immunohistochemical and immunoradiometric study. *Eur J Cancer* 32A: 1585-1590, 1996.
  17. Chaubert P, Bouzourene H, Saraga E. Estrogen and progesterone receptors and pS2 and ERD5 antigens in gastric carcinomas from the European population. *Mod Pathol* 9: 189-193, 1996.
  18. Singh S, Poulson R, Wright NA, Sheppard MC, Langman MJS. Differential expression of oestrogen receptor and oestrogen inducible genes in gastric mucosa and cancer. *Gut* 40: 516-520, 1997.
  19. Tomasetto C, Rio MC, Gautier C, Wolf C, Hareuveni M, Chambon P, et al. hSP, the domain-duplicated homologue of pS2 protein, is co-expressed with pS2 in stomach but not in breast cancer. *EMBO J* 9: 407-414, 1990.