

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του πυρηνικού αντιγόνου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA), της πρωτεΐνης του γονιδίου p53 και της καδεψίνης D στο διηθητικό καρκίνωμα του μαστού.

Δ. Μηλιαράς, Α. Καμάς, Χ. Καλέκου-Γρέκα

Σε αυτή την μελέτη έγινε ανίχνευση του πυρηνικού αντιγόνου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (PCNA), της πρωτεΐνης του γονιδίου p53 και της καδεψίνης D σε τομές παραφίνης απο διηθητικά καρκινώματα του μαστού με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Το υλικό μας αποτελούσαν 50 γυναίκες ηλικίας 27-79 ετών. Η εκατοστιαία αναλογία των πυρήνων που ήταν θετικοί στο PCNA (μέση τιμή: $43.01\% \pm 31.49$), η έκφραση της καδεψίνης D (χωριστά για [1] τα νεοπλασματικά κύτταρα και [2] τα μακροφάγα και στρωματικά κύτταρα του όγκου), καθώς και η θετικότητα στην πρωτεΐνη p53, διερευνήθηκαν ως προς την σχέση τους με την ηλικία των ασθενών, το μέγεθος και τον βαθμό κακοήθειας του όγκου, τον ιστολογικό τύπο, τις λεμφαδενικές μεταστάσεις και την παρουσία οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων. Από αυτές τις παραμέτρους βρέθηκε σημαντική συσχέτιση της θετικότητας, τόσο του PCNA, όσο και της πρωτεΐνης του p53, με την αυξημένη έκφραση της καδεψίνης D στα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα ($p < 0.001$ και $p < 0.05$ αντίστοιχα). Ακόμη παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ αυξημένης έκφρασης του PCNA και της θετικότητας στην πρωτεΐνη p53 ($p < 0.05$). Η συσχέτιση μεταξύ της θετικότητας στην πρωτεΐνη p53 και του αυξημένου ποσοστού πυρήνων θετικών στο PCNA, είναι συμβατή με την βιολογική δράση που πιστεύεται πως έχει το γονίδιο p53 και τον ρόλο του στον καρκίνο. Η συσχέτιση της θετικότητας, τόσο του PCNA, όσο και της πρωτεΐνης του p53, με την αυξημένη έκφραση της καδεψίνης D στα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα, ως ένα βαθμό ενισχύει προηγούμενη δική μας υπόθεση αλλά και άλλων συγγραφέων, όπου αυξημένη έκφραση της καδεψίνης D στα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα, πιθανώς υποδηλώνει πιο επιθετική συμπεριφορά στους όγκους αυτούς.

Λέξεις κλειδιά: PCNA, πρωτεΐνη p53, cathepsin D, καρκίνωμα του μαστού,

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γενικά παραδεκτό ότι η εκτίμηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός όγκου και ειδικότερα του καρκίνου του μαστού, έχει προγνωστική σημασία^{1,2}. Παλαιότερα, η εκτίμηση αυτή γινόταν με δύο κυρίως τρόπους: ο πρώτος και απλούστερος είναι η μέτρηση των πυρηνοκινησιών ανα μεγάλο οπτικό πεδίο. Η μέτρηση των πυρηνοκινησιών έχει αποδειχθεί αρκετά αξιόπιστη για αυτόν τον σκοπό με δύο προϋποθέσεις: τον σαφή καθορισμό του εμβαδού του οπτικού πεδίου και των κριτηρίων αναγνώρισης των μιτώσεων^{3,4}. Ο δεύτερος τρόπος είναι η χρήση ραδιοσημασμένης θυμιδίνης, ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων του όγκου που βρίσκονται στην φάση S του κυτταρικού κύκλου^{5,6}. Η μέθοδος αυτή είναι τεχνικά κοπιώδης και απαιτεί χρησιμοποίηση ραδιενεργών υλικών. Εναλλακτικά, για την εκτίμηση της φάσης S, σήμερα χρησιμοποιείται ευρέως η κυτταρομετρία ροής⁷.

Ένας άλλος τρόπος εκτίμησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού του καρκινώματος του μαστού, είναι η χρήση αντισωμάτων έναντι αντιγόνων που εκφράζονται κατά την διάρκεια των φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει στον μαστό με αυτή την μέθοδο προσέγγισης, έχουν χρησιμοποιήσει το αντίσωμα Ki-67, το οποίο αρχικά εφαρμοζόταν μόνο σε τομές κρουστάτη. Η πρόσφατη έρευνα έχει δείξει ότι υπάρχει καλή αντιστοιχία μεταξύ των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής χρώσης με Ki-67, της κυτταρομετρίας ροής, της μέτρησης μιτώσεων και του δείκτη ραδιοσημασμένης θυμιδίνης^{4,8}. Άλλα αντισώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, είναι αυτά που στρέφονται έναντι του πυρηνικού αντιγόνου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Proliferating Cell Nuclear Antigen - PCNA), ορισμένα από τα οποία είναι δυνατόν να εφαρμοσθούν σε τομές παραφίνης⁹.

Το PCNA είναι co-factor της DNA πολυμεράσης δ, η οποία είναι απαραίτητη για τον αναδιπλασιασμό του DNA¹⁰. Το γονίδιο του PCNA που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 20¹¹, έχει κλωνοποιηθεί και η αλληλουχία των βάσεων του έχει πλήρως ταυτοποιηθεί¹². Τα επίπεδα αυτής της πυρηνικής πρωτεΐνης είναι σχεδόν μηδενικά στην φάση G₀ του κυτταρικού κύκλου, ανεβαίνουν στο μέσον της φάσης G₁, κορυφώνονται στη φάση S και αρχίζουν να

ελαττώνονται στην μετάβαση από τις φάσεις G₂/M στην φάση G₁¹³.

Το γονίδιο p53 εντοπίζεται στην ζώνη p13.1 του χρωμοσώματος 17¹⁴ και η μετάλλαξη του έχει βρεθεί σε πληθώρα κακοήδων όγκων, μεταξύ των οποίων και το καρκίνωμα του μαστού¹⁵. Στην φυσιολογική του μορφή (άγριος τύπος), το γονίδιο p53 κωδικοποιεί μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 53 kD, που ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο, την επιδιόρθωση και την σύνδεση του DNA, την κυτταρική διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση)¹⁶. Έτσι, το p53 περιγράφεται σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο, η μετάλλαξη του οποίου οδηγεί σε καρκινογένεση με την συνεργασία και άλλων ογκογονιδίων¹⁷. Οι περισσότερες μεταλλάξεις του γονιδίου p53 έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης p53¹⁶. Κατά συνέπεια, η συκέντρωση της πρωτεΐνης p53 μέσα στους πυρήνες αυξάνει και είναι δυνατόν να ανιχνευθεί ανοσοϊστοχημικά. Σημειώνεται πάντως ότι η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της πρωτεΐνης p53 δεν θα πρέπει να ταυτίζεται με μετάλλαξη του αντίστοιχου γονιδίου, αφού σε λίγες περιπτώσεις η φυσιολογική πρωτεΐνη p53 μπορεί να παραμένει ανενεργής και σταθεροποιημένη μέσα στο κυτταρόπλασμα, ορισμένες φορές συνδεδεμένη με άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες.

Η καδεψίνη D είναι μία λυσοσωμική πρωτεάση που ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα και άλλους αυξητικούς παράγοντες και φαίνεται πως έχει μιτωγόνο δράση και σχέση με την διαδικασία της μετάστασης^{18,19}. Πολλές μελέτες αποδίδουν προγνωστική σημασία στην ανίχνευση της καδεψίνης D στο καρκίνωμα του μαστού, τα αποτελέσματα όμως από την σύγκριση μεταξύ ραδιοανοσολογικών και βιοχημικών μεθόδων ποσοτικής μέτρησης αφ' ενός και ανοσοϊστοχημικών μεθόδων αφ'ετέρου, είναι ποικίλα και αντικρουόμενα μεταξύ τους. Έτσι, μέτρηση αυξημένης ποσότητας καδεψίνης D σε όγκο μαστού, έχει συχνά σχετισθεί με δυσμενή πρόγνωση²⁰⁻²². Από την άλλη μεριά οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες προσδίδουν άλλοτε επιβαρυντικό^{23,24} και άλλοτε ευνοϊκό ρόλο²⁵ στην αυξημένη έκφραση της καδεψίνης D, ενώ ορισμένες άλλες εργασίες δεν της αποδίδουν καμία προγνωστική σημασία^{26,27}.

Αρκετές μελέτες έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα, που να αφορούν την ανοσοϊστοχημική έκφραση του PCNA στο καρκίνωμα του μαστού^{9,28-37}, λίγες όμως από αυτές συσχετί-

ζουν την έκφραση αυτή με την ανίχνευση της πρωτεΐνης p53^{33-35,37}. Επιπρόσθετα, στη προστιτή σε μας βιβλιογραφία, δεν αναφέρονται εργασίες που να έχουν μελετήσει ταυτόχρονα τους δύο αυτούς παράγοντες σε σχέση με την καδεψίνη D. Έτσι στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την έκφραση του PCNA, της καδεψίνης D και της πρωτεΐνης p53 στο αδενοκαρκίνωμα του μαστού, καθώς και την σχέση τους με παράγοντες που θεωρούνται προγνωστικοί δείκτες σε αυτή την μορφή καρκίνου.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΟ

Στην μελέτη μας περιλαμβάνονται 50 γυναίκες, ηλικίας 29-79 ετών, με καρκίνωμα του μαστού που υποβλήθηκαν σε μαστεκτομή κατά το χρονικό διάστημα 1990-1993. Εικοσιοκτώ ασθενείς είχαν αρνητικούς για μεταστάσεις μασχαλιαίους λεμφαδένες και 22 ασθενείς δετικούς.

Τα χειρουργικά παρασκευάσματα μονιμοποιήθηκαν σε ουδέτερη φορμόλη 10% και μετά από έγκλειση σε παραφίνη, οι τομές βάφθηκαν με χρώση ρουτίνας αιματοξυλίνης-εωσίνης. Παράμετροι που αξιολογήθηκαν ήταν η ηλικία των ασθενών, το μέγεθος του όγκου όπως καταγράφηκε στην ιστοπαθολογική έκθεση (δύο κατηγορίες: <2εκ. και >2εκ.), ο ιστοπαθολογικός τύπος (πορογενές/λοβιακό), ο βαθμός κακοήθειας του όγκου σύμφωνα με τα κριτήρια των Bloom & Ritchardson³⁸, η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, οι ορμονικοί υποδοχείς και η ανοσοϊστοχημική έκφραση της καδεψίνης D. Οι οιστρογονικοί υποδοχείς προσδιορίσθηκαν σε 41 ασθενείς με την βιοχημική μέθοδο άνδρακα-δεξτράνης. Με την ίδια μέθοδο προσδιορίσθηκαν οι προγεστερονικοί υποδοχείς σε 23 ασθενείς. Θετικοί υποδοχείς θεωρήθηκαν τιμές άνω των 10 fmol/mg πρωτεΐνης ιστού για τους οιστρογονικούς υποδοχείς και 25 fmol/mg πρωτεΐνης για τους προγεστερονικούς υποδοχείς.

Η ανοσοϊστοχημική διερεύνηση έγινε με μέθοδο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης και χρήση διαμινοβενζιδίνης (DAB) ως χρωμογόνου παράγοντα. Σε μία τομή από κάθε όγκο εφαρμόσθηκαν τα εξής μονοκλωνικά αντισώματα: αντι-PCNA (1:50, Oncogene Science, Η.Π.Α.), αντι-πρωτεΐνη p53 (προαραιωμένο, Euro-DPC, Ηνωμένο Βασίλειο) και αντι-καδεψίνη D (προαραιωμένο, Euro-DPC, Ηνωμένο Βασίλειο).

Για την αξιολόγηση του PCNA, επιλέχθη-

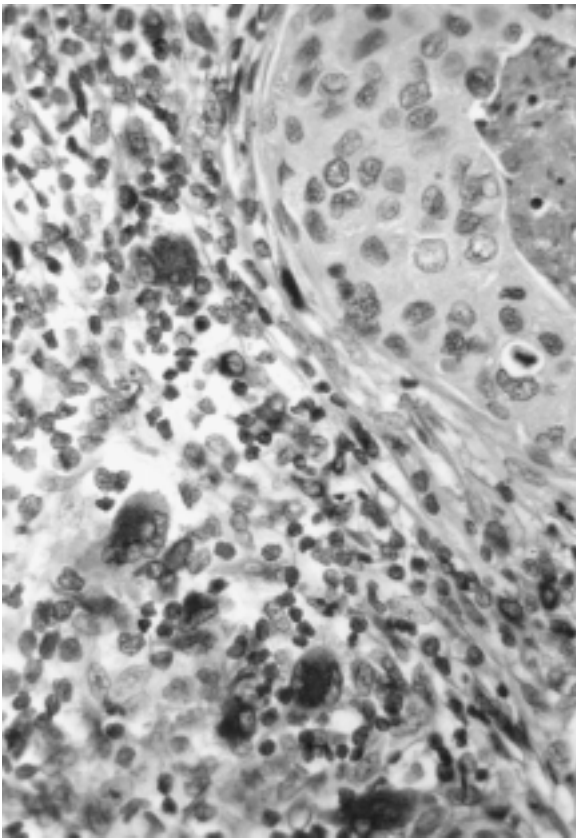
καν οι περιοχές με την εντονότερη και πλέον εκτεταμένη χρώση και εκεί μετρήθηκε ο αριθμός των δετικών πυρήνων σε τρία οπτικά πεδία (Χ400). Ο βαθμός της δετικότητας στο PCNA, εκφράσθηκε ως το ποσοστό των δετικών πυρήνων επί του συνόλου των νεοπλασματικών κυττάρων στα πεδία αυτά. Από την αξιολόγηση του PCNA αποκλείσθηκαν δύο περιπτώσεις που δεν εμφάνιζαν ικανοποιητική χρώση. Θετικές στην πρωτεΐνη p53 θεωρήθηκαν όλες οι περιπτώσεις που είχαν δετική πυρηνική χρώση. Η αξιολόγηση της καδεψίνης D, έγινε χωριστά για τα καρκινικά κύτταρα και χωριστά για τα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα. Στα καρκινικά κύτταρα αξιολογήθηκε η ένταση της χρώσης σε τέσσερις διαβαθμίσεις (0: αρνητικό, 1: ασθενής χρώση, 2: μέτρια χρώση, 3: έντονη χρώση) και η έκταση της χρώσης σε τρεις διαβαθμίσεις (0: αρνητικό, 1: εστιακή, 2: διάχυτη). Από την άρριση των δύο αυτών μετρήσεων προέκυψε ένας συνδυασμένος δείκτης καδεψίνης D (δκ) για τα καρκινικά κύτταρα, που θεωρήθηκε χαμηλός όταν ήταν από 0 έως 2 και υψηλός όταν ήταν από 3 έως 5. Στα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα αξιολογήθηκε η ένταση και η έκταση της χρώσης σε τρεις διαβαθμίσεις (0: αρνητικό, 1: ασθενής ή μέτρια χρώση, 2: έντονη χρώση). Χαμηλός δκ για τα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα θεωρήθηκε από 0 έως 1 και υψηλός όταν ήταν 2.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων όσον αφορά το PCNA, έγινε με την δοκιμασία ομογένειας για μέσες τιμές (Student t-test), ενώ για την πρωτεΐνη p53 με την ακριβή μέθοδο του Fischer, επειδή το δείγμα μας ήταν σχετικά μικρό³⁹. Στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε ένα αποτέλεσμα όταν $p \leq 0,05$.

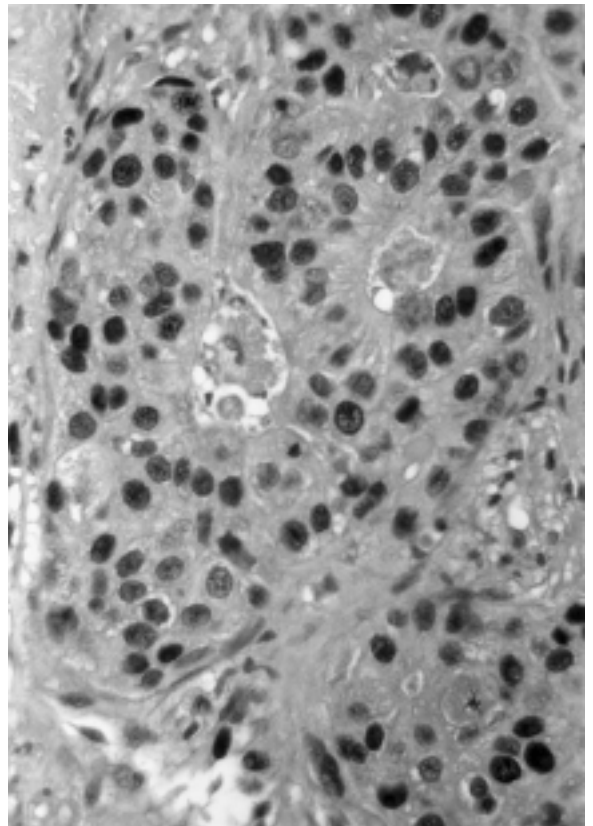
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1) *Καδεψίνη D*. Εικοσιένα περιπτώσεις είχαν χαμηλό δείκτη καδεψίνης D στα νεοπλασματικά κύτταρα, ενώ οι υπόλοιπες 29 περιπτώσεις είχαν υψηλό δείκτη. Στα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα, 19 περιπτώσεις είχαν χαμηλό δείκτη καδεψίνης D και 31 υψηλό (Εικ. 1). Η σχέση του δείκτη καδεψίνης D με το PCNA και το p53 αναφέρεται παρακάτω.

2) *PCNA*. Η μέση τιμή του ποσοστού των δετικών πυρήνων των νεοπλασματικών κυττάρων στο σύνολο των όγκων που εξετάσαμε ήταν 43.01 ± 31.49 (Εικ. 2). Όπως φαίνεται στον



Εικόνα 1. Έντονα δετική χρώση στη καδεψίνη D, σε μακροφάγα του υποστρώματος καρκινώματος του μαστού. Τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι αρνητικά (X400).



Εικόνα 2. Θετική χρώση στο PCNA σε μεγάλο αριθμό πυρήνων πορογενούς καρκινώματος του μαστού (X400).

Πίνακα 1, από τις παραμέτρους που ελέγχθηκαν, μόνο η χρώση της καδεψίνης D στα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα, καθώς και η δετικότητα των πυρήνων των νεοπλασματικών κυττάρων στην πρωτεΐνη p53, είχαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το ποσοστό των δετικών πυρήνων στο PCNA. Συγκεκριμένα, η μέση τιμή του ποσοστού των δετικών πυρήνων στο PCNA στις περιπτώσεις με χαμηλό δείκτη καδεψίνης D στα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα ήταν $24,75 (\pm 27,96)$, ενώ στις περιπτώσεις με υψηλό δείκτη καδεψίνης D ήταν $55,92 (\pm 27,33)$ ($p < 0,001$). Ως προς την πρωτεΐνη p53, παρατηρείται ότι οι αρνητικές περιπτώσεις είχαν μέση τιμή δετικών πυρήνων στο PCNA $38,05 (\pm 31,31)$, ενώ οι δετικές περιπτώσεις $61,6 (\pm 25,49)$. Από τις υπόλοιπες παραμέτρους, παρά το ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις επιμέρους κατηγορίες, είναι αξιοσημείωτο ότι όγκοι με αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς είχαν αρκετά

υψηλότερο ποσοστό δετικών πυρήνων στο PCNA ($54,14 \pm 31,44$) συγκριτικά με τους όγκους με δετικό αυτόν τον υποδοχέα ($41,53 \pm 32,14$) και καρκινώματα με βαθμό κακοήθειας I είχαν χαμηλότερο ποσοστό δετικών πυρήνων στο PCNA ($39,51 \pm 31,48$) από τα καρκινώματα βαθμού κακοήθειας II και III ($47,5 \pm 31,6$).

3) *Πρωτεΐνη p53*. Στον Πίνακα 2 φαίνεται η σχέση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για την πρωτεΐνη p53 με την ηλικία των ασθενών, το μέγεθος του όγκου, τον ιστοπαθολογικό τύπο, τον βαθμό κακοήθειας του όγκου, την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων, τους ορμονικούς υποδοχείς και την ανοσοϊστοχημική έκφραση της καδεψίνης D (Εικ. 3). Από αυτές τις παραμέτρους στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρουσιάζει η χρώση της καδεψίνης D στα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα. Πιο αναλυτικά, μόνο μία περίπτωση με χαμηλό δείκτη καδεψίνης D στα στρωματικά κύτταρα είχε δετικό p53 (5,26%), ενώ από τις περιπτώ-

Πίνακας 1. Συσχέτιση του ποσοστού των δετικών πυρήνων στο PCNA, με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

Παράμετρος		v	M.T.	Σ.Α.	p
Ηλικία:	< 50	13	40,38	30,14	
	≥ 50	35	43,94	32,32	-
Μέγεθος:	< 2εκ.	16	45,75	28,10	
	≥ 2εκ.	32	41,65	33,37	-
Ιστολογικός τύπος:	πορογενές	40	43,29	32,19	
	λοβιακό	8	41,50	29,69	-
Βαθμός κακοήθειας:	I	27	39,51	31,48	
	II & III	21	47,50	31,60	-
Λεμφαδενικές μεταστάσεις:	(-)	27	46,80	32,65	
	(+)	21	39,80	30,60	-
ER	(+)	32	41,53	32,14	
	(-)	7	54,14	31,44	-
PgR	(+)	13	38,38	32,46	
	(-)	10	41,96	35,91	-
Καδεψίνη D (νεοπλ. κυττ.)	χαμηλή	17	39,64	31,42	
	υψηλή	31	44,74	31,89	-
Καδεψίνη D (στρωμ. κυττ.)	χαμηλή	20	24,75	27,96	
	υψηλή	28	55,92	27,35	0,001
p53	(-)	38	38,05	31,31	
	(+)	10	61,60	25,49	0,05

v=αριθμός περιπτώσεων, M.T.=μέση τιμή, Σ.Α.=σταθερή απόκλιση, ER=οιστρογονικοί υποδοχείς, PgR=προγεστερονικοί υποδοχείς.

Πίνακας 2. Συσχέτιση της δετικότητας στην πρωτεΐνη p53 με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

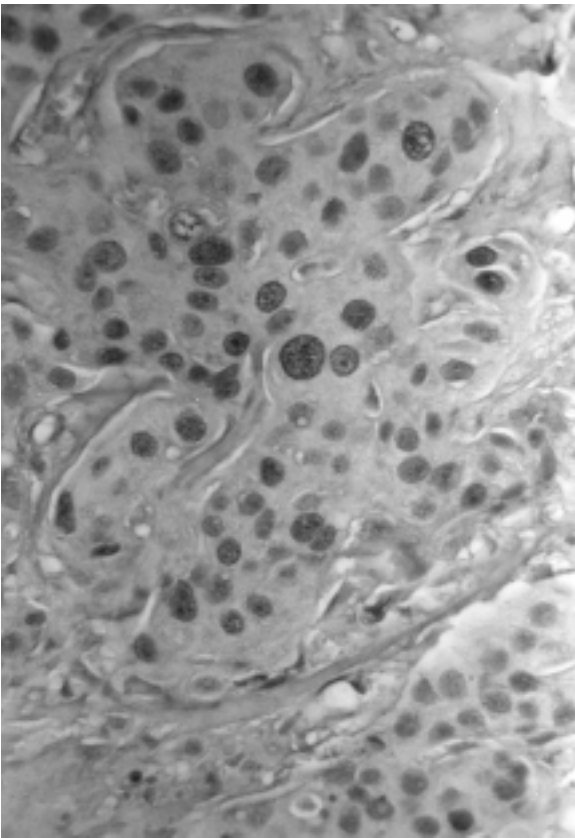
Παράμετρος		p53(+)	p53(-)	p
Ηλικία:	< 50	3	12	
	≥ 50	8	27	0,28
Μέγεθος:	< 2 εκ.	2	12	
	≥ 2 εκ.	9	27	0,22
Ιστολογικός τύπος:	πορογενές	10	32	
	λοβιακό	1	7	0,31
Βαθμός κακοήθειας:	I	4	24	
	II & III	7	15	0,09
Λεμφαδενικές μεταστάσεις:	(-)	5	18	
	(+)	6	21	0,26
ER	(+)	7	24	
	(-)	3	7	0,84
PgR	(+)	3	10	
	(-)	7	3	0,1
Καδεψίνη D (νεοπλ. κυττ.)	χαμηλή	6	15	
	υψηλή	5	24	0,17
Καδεψίνη D (στρωμ. κυττ.)	χαμηλή	1	18	
	υψηλή	10	21	0,02

σεις με υψηλό δείκτη καδεψίνης D, δέκα είχαν δετικό p53 (32,25%) (p<0,02). Από τα υπόλοιπα αποτελέσματα είναι ενδιαφέρον ότι όγκοι βαθμού κακοήθειας II και III είχαν συχνότερα

δετικό p53 (31,81%) από όγκους βαθμού κακοήθειας I (14,28%) (p<0,09), καθώς και όγκοι μεγαλύτεροι από 2 εκατοστά είχαν συνηθέστερα δετικό p53 (25%) από όγκους μικρότερους από 2 εκατοστά (14,28%) (p<0,22.).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το καρκίνωμα του μαστού είναι ο συχνότερος κακοήθης όγκος και η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες. Η ανεύρεση προγνωστικών δεικτών για τον καρκίνο του μαστού έχει απασχολήσει ιδιαίτερα την ιατρική έρευνα τα τελευταία χρόνια. Έτσι, εκτός από τους κλασσικούς προγνωστικούς παράγοντες (μέγεθος του όγκου, βαθμός κακοήθειας, λεμφαδενικές μεταστάσεις, ορμονικοί υποδοχείς) έχουν δοκιμασθεί και προταθεί ως προγνωστικοί δείκτες η πλοειδικότητα του όγκου, δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού όπως η εκτίμηση της φάσης S του κυτταρικού κύκλου και το αντιγόνο Ki-67, διάφορα ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το c-erbB-2 και το p53, η καδεψίνη D, ο υποδοχέας του επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης (EGFR), η πρωτεΐνη pS2, η κολλαγενάση IV, η αγγειογένεση κ.α.^{1,6-8,40-45}. Η ανάγκη αυτή προέκυψε



Εικόνα 3. Μεγάλος αριθμός πυρήνων δετικός στην πρωτεΐνη p53, σε πορογενές καρκίνωμα του μαστού (X400).

απο το γεγονός ότι περίπου το 30% των γυναικών με καρκίνωμα του μαστού, οι οποίες έχουν αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, στην συνέχεια υποτροπιάζουν και τελικά πεθαίνουν απο την νόσο.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η μετάλλαξη του γονιδίου p53 σε διάφορες μορφές καρκίνου, πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην καρκινογένεση, λόγω της απώλειας του ελέγχου πάνω στον κυτταρικό κύκλο, που φυσιολογικά ασκεί αυτό το γονίδιο. Δεν είναι άλλωστε τυχαίο ότι το p53 αποτελεί το γονίδιο που συχνότερα μεταβάλλεται (μεταλλάσσεται ή υπερεκφράζεται) στον καρκίνο του ανθρώπου εν γένει¹⁶. Στη μελέτη μας και σε συμφωνία με παρατηρήσεις στη βιβλιογραφία, το p53 ήταν συχνότερα δετικό σε υψηλού παρά σε χαμηλού βαθμού κακοήδεις όγκους^{29,37,46}, καθώς και σε όγκους με αρνητικούς προγεστερονικούς υποδοχείς, χωρίς όμως τα ευρήματα αυτά να είναι στατιστικά σημαντικά. Αντιστρόφως, οι όγκοι με δετι-

κό p53 είχαν υψηλότερο δείκτη πολλαπλασιασμού, όπως αυτή εκφράζεται με την ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του PCNA. Επιπρόσθετα, όλοι οι όγκοι, πλην ενός, που είχαν έκφραση της πρωτεΐνης p53, εμφάνιζαν υψηλό δείκτη καδεψίνης D στα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα. Η αυξημένη έκφραση καδεψίνης D στο στρώμα του όγκου έχει βρεθεί να σχετίζεται με επιθετικό φαινότυπο, τόσο σε προηγούμενη δική μας μελέτη⁴⁷, όσο και από άλλους συγγραφείς^{36,48,49}. Η δράση αυτή εξηγείται από την πρωτεολυτική δράση που έχει η καδεψίνη D επάνω σε διάφορες ουσίες, μεταξύ των οποίων πρωτεογλυκάνες και βασικές μεμβράνες¹⁸. Έτσι η απελευθέρωση της καδεψίνης D από τα στρωματικά κύτταρα του όγκου μπορεί να διευκολύνει την διηθητική ανάπτυξη ενός καρκίνου. Όλα τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνουν το σημαντικό ρόλο του γονιδίου p53 στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού και την συσχέτιση του με όγκους επιθετικούς, υψηλής κακοήδειας.

Η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση του PCNA αποτελεί μία από τις απλούστερες τεχνικά μεθόδους για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού⁹. Παρά την προτίμηση που αρκετοί ερευνητές δείχνουν για το Ki-67, το PCNA θεωρείται αξιόπιστος δείκτης, αφού η έκφραση του συμβαδίζει με άλλους δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως το αντιγόνο Ki-67, η βρωμοδεοξουριδίνη (BrdU) και η κυτταρομετρία ροής^{35,50}. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι η έκφραση του PCNA είναι πιο υψηλή στα καρκινώματα με υψηλή κακοήδεια, και ιδιαίτερα στα καρκινώματα με έκφραση της πρωτεΐνης του γονιδίου p53. Το τελευταίο εύρημα είναι αναμενόμενο, αφού το p53 θεωρείται ως ένα από τα κύρια γονίδια που ασκούν έλεγχο πάνω στον κυτταρικό κύκλο. Ανάλογα αποτελέσματα άλλωστε είχαν και άλλοι συγγραφείς^{35,37,51}. Ακόμη, όπως και με την έκφραση του p53, έτσι και η αυξημένη έκφραση του PCNA, σχετίζεται με αυξημένη έκφραση της καδεψίνης D στα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα. Φαίνεται λοιπόν πως η ανίχνευση της πρωτεΐνης p53 και η αυξημένη έκφραση του PCNA στα καρκινικά κύτταρα, σε συνδυασμό με υψηλό δείκτη καδεψίνης στα στρωματικά κύτταρα και μακροφάγα, ταυτοποιούν μία ομάδα καρκινωμάτων με επιθετικούς χαρακτηρισές.

Η διαδικασία της εξαλλαγής και στη συνέχεια της διηθητικής ανάπτυξης και μετάστα-

σης, μπορεί να ακολουθήσει διάφορους δρόμους και με διαφορετική ταχύτητα, που μπορεί να ποικίλλει από άτομο σε άτομο. Κατά συνέπεια η δυνατότητα καθορισμού της πιθανότητας υποτροπής και της περαιτέρω βιολογικής συμπεριφοράς κάθε περίπτωσης καρκίνου, θα επιτρέψει την έγκαιρη και εξατομικευμένη κλινική παρέμβαση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τον προσδιορισμό-ανίχνευση ορι-

σμένων δεικτών (γονίδια, πρωτεΐνες), όπως αυτές που μελετήσαμε στη παρούσα εργασία και οι οποίες φαίνεται να προσδιορίζουν ένα επιδεδικό φαινότυπο. Η πρόσφατη βιβλιογραφία υποστηρίζει την χρησιμότητα προσδιορισμού του επιδεδικού φαινότυπου⁵² και ένα σημαντικό μέρος της έρευνας ήδη εστιάζεται προς αυτή την κατεύθυνση.

SUMMARY

Immunohistochemical expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p53-gene protein, and cathepsin D in invasive breast carcinoma.

Miliaras D, Kamas A, Kalekou-Greka H.

Pathology Department, "Aghios Pavlos" 1st General Hospital, Thessaloniki, Greece.

In this study we detected the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), p53-gene protein, and cathepsin D, in paraffin sections from cases of invasive breast carcinoma, using monoclonal antibodies. Our material included 50 female patients, 27-79 years old. The percentage of PCNA-positive nuclei (mean: 43.01%±31.49), the expression of cathepsin D (separately evaluated in: [1] cancer cells, and [2] stromal cells and macrophages), and the positivity to p53 protein, were analyzed in relation to patient's age, tumor size, histological grade and type, lymph node metastases, and estrogen and progesterone receptors. Of these parameters, a statistically significant correlation was found between high expression of PCNA and high cathepsin index in stromal cells and macrophages ($p<0.001$), as well as between p53 positivity and high cathepsin index in stromal cells and macrophages ($p<0.05$). In addition, high PCNA expression was related to p53 protein positivity ($p<0,05$). The association between p53 protein positivity and increased PCNA expression is consistent with the postulated biological action of p53 gene, and its role in cancer. The correlation of increased PCNA expression, as well as of p53 protein detection, with high cathepsin index in stromal cells and macrophages, supports our previous and other author's assumption, that increased cathepsin expression in stromal cells and macrophages, probably indicates a more aggressive behavior in these tumors.

Key words: PCNA, p53 protein, cathepsin D, breast carcinoma.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Silvestrini R, Daidone MG, Gasparini G. Cell kinetics as a prognostic marker in node-negative breast cancer. *Cancer* 56:1982-1987, 1985.
2. McGuire WL, Tandon AK, Chamness GC, Clark GM. How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 82:1006-1015, 1990.
3. Baak JPA. Mitosis counting in tumors. *Hum Pathol* 21:683-685, 1990.
4. Isola JJ, Helin HJ, Helle MJ, Kallionemi O-P. Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow-cytometric analysis and mitotic count. *Cancer* 65:1180-1184, 1990.
5. Hery M, Gioanni J, Lalanne CM, Namer M, Courdi A. The DNA labelling index: A prognostic factor in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 9:207-211, 1987.
6. Meyer JS, Friedman E, McCrate M, Bauer WC. Prediction of early course of breast carcinoma by thymidine labelling. *Cancer* 51:1879-1886, 1983.

7. Dressler LG, Seamer LC, Owens MA, Clark GM, McGuire WL. DNA flow-cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimens. *Cancer* 61:420-427, 1988.
8. Rudas M, Gnant MF, Mittlbock M, Neumayer R, Kummer A, Jakesz R, Reiner G, Reiner A. Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in breast cancer: comparison and correlation with prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 32: 165-175, 1994.
9. Fiersen HF, Jr. Immunohistochemical analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in infiltrating ductal carcinomas: comparison with clinical and pathologic variables. *Mod Pathol* 6: 290-294, 1993.
10. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of polymerase-delta. *Nature* 326:515-517, 1987.
11. Ku DH, Travali S, Calabretta B, Huebner K, Baserga R. Human gene for proliferating cell nuclear antigen has pseudogenes and localizes to chromosome 20. *Somat Cell Mol Genet* 15:297-307, 1989.
12. Travali S, Ku DH, Rizzo MG, Ottavio L, Baserga R, Calabretta B. Structure of human gene for proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 264:7466-7472, 1989.
13. Bolton WE, Mikulka WR, Healy CG, Scmitling RJ, Kenyon NS. Expression of proliferation associated antigens in the cell cycle of synchronized mammalian cells. *Cytometry* 13:117-126, 1992.
14. Levine AJ. The p53 tumor suppressor gene and product. *Cancer Surv* 12:59-79, 1992.
15. Thor AD, Yandell DW. Prognostic significance of p53 overexpression in node-negative breast carcinoma. Preliminary studies support cautious optimism. *J Natl Cancer Inst* 85:176-177, 1993.
16. Batsakis JG, El-Naggar AK. p53: Fifteen years after discovery. *Adv Anat Pathol* 2:71-88, 1995.
17. Momand J, Zambett GP, Olson DC, George DL, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245, 1992.
18. Capony F, Morisset M, Barret A, et al. Phosphorylation, glycosylation, and proteolytic activity of 52-KDa estrogen-induced protein secreted by MCF-7 cells. *J Cell Biol* 104:352-362, 1987.
19. Garcia M, Platet N, Liaudet E, Laurent V, Derocq D, Brouillet JP, Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells* 14:642-650, 1996.
20. Spyrtatos F, Bruillet JP, Dafrenne A, et al. Cathepsin D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 2:1115-1118, 1989.
21. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL. Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 322:297-302, 1990.
22. Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M, et al. Association between high concentration of Mw 52.000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res* 49:6608-6614, 1989.
23. Isola J, Weitz S, Visakorpi T, et al. Cathepsin D Expression detected by immunohistochemistry has independent prognostic value in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 11:36-43, 1993.
24. Winstanley JH, Leinster SJ, Cooke TG, Westley BR, Platt-Higgins AM, Rudland PS. Prognostic significance of cathepsin D in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 67:767-772, 1993.
25. Henry JA, McCarthy AL, Angus B, et al. Prognostic significance of estrogen-regulated protein, cathepsin D, in breast cancer. *Cancer* 65:265-271, 1990.
26. Domagala W, Stiker G, Szadowska A, Ducowicz A, Weber K, Osborn M. Cathepsin D in invasive ductal NOS breast carcinoma as defined by immunohistochemistry: no correlation with survival at 5 years *Am J Pathol* 141: 1003-1012, 1992.
27. Kandalaf PL, Chang KL, Ahn CW, Traweek ST, Mehia P, Battifora H. Prognostic significance of immunohistochemical analysis of cathepsin D in low stage breast cancer. *Cancer* 71:2756-2763, 1993.
28. Thomas N, Noguchi M, Kitagawa H, Kinoshita K, Miyazaki I. Poor prognostic value of proliferating cell nuclear antigen labelling index in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 46:525-528, 1993.
29. Aaltomaa S, Lipponen P, Syrjanen K. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolabelling as a prognostic factor in axillary lymph node-negative breast cancer. *Anticancer Res* 13:533-538, 1993.
30. Tomasino RM, Ruso A, Bazan V, et al. Evaluation of integrated morphobiological indicators in breast carcinoma. *In Vivo* 7:601-605, 1993.
31. Gillett CE, Barnes DM, Camplejohn RS. Comparison of the three cell cycle associated antigens as markers of proliferative activity and prognosis in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 46:1126-1128, 1993.
32. Betta BG, Bottero G, Pavesi M, Pastormerlo M, Bellinger D, Tallarida F. Cell proliferation

- in breast carcinoma assessed by a PCNA grading system and its relation to other prognostic variables. *Surg Oncol* 2:59-63, 1993.
33. Mariuzzi G, Sisti S. Multivariate quantitative histopathological assessment of prognostic factors in ductal infiltrating carcinoma. *In Vivo* 7:357-361, 1993.
 34. Sch"nborn I, Minguillon C, Lichtenegger, W, Zschesche W, Spitzer E. c-erbB-2, EGF receptor, p53 and PCNA. The prognostic significance of recent tumor markers for lymph node negative breast cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 55:566-571, 1995.
 35. Moriki T, Takahashi T, Kataoka H, Hiroi M, Yamane T, Hara H. Proliferation marker MIB-1 correlates well with proliferative activity evaluated by BrdU in breast cancer; an immunohistochemical study including correlation with PCNA, p53, c-erbB-2 and estrogen receptor status. *Pathol Int* 46:953-961, 1996.
 36. Ioachim E, Kamina S, Kontostolis M, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of cathepsin D in correlation with extracellular matrix component, steroid receptor status and proliferative indices in breast cancer. *Virchows Arch* 431:311-316, 1997.
 37. Haerslev T, Jacobsen GK. An immunohistochemical study of p53 with correlations to histopathological parameters, c-erbB-2, proliferating cell nuclear antigen, and prognosis. *Hum Pathol* 26:295-301, 1995.
 38. Elston CW. Grading of invasive breast carcinoma. In: Page DL, Anderson TJ (eds) *Diagnostic Histopathology of the breast*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1987:300-311.
 39. Αναστασιάδης ΙΑ. Στοιχεία Στατιστικής, Αριστοτέλιο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, 1978.
 40. Gasparini G, Boracchi P, Bevilacqua P, Mezzetti M, Pozza F, Weidner N. A multiparametric study on the prognostic value of epidermal growth factor receptor in operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 29:59-71, 1994.
 41. Visscher DW, Castellani R, Wykes SM, Sarkar SM, Hussain ME. Concurrent abnormal expression of erbB-2, EGFR, and p53 genes and clinical disease progression of breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 28:261-266, 1993.
 42. Martinazzi M, Crivelli F, Zampatti C, Martinazzi S. Relationships between epidermal growth factor (EGF-R) and other predictors of prognosis in breast carcinomas. An immunohistochemical study. *Pathologica* 85:637-644, 1993.
 43. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 12:454-466, 1994.
 44. Ferrandina G, Scambia G, Bardelli F, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Messori A. Relationship between cathepsin-D content and disease-free survival in node-negative breast cancer patients: a meta-analysis. *Br J Cancer* 76:661-666, 1997.
 45. Weidner N, Semple PJ, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis - Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324:1-8, 1991.
 46. Dunn JM, Hastrich DJ, Newcomb P, Webb JC, Maitland NJ, Farndon JR. Correlation between p53 mutations and antibody staining in breast carcinoma. *Br J Surg* 80:1410-1412, 1993.
 47. Μηλιαράς Δ, Καμάς Α, Καλέκου Χ, Αντώνογλου Ο. Ανοσοϊστοχημική διερεύνηση της καθεψίνης D στο αδενοκαρκίνωμα του μαστού: συσχέτιση με την παρουσία ορμονικών υποδοχέων και άλλους προγνωστικούς δείκτες. *Ελληνική Ιατρική* 62: 507-513, 1996.
 48. Tetu B, Brisson J, Cote C, Brisson S, Potvin D, Roberge N. Prognostic significance of cathepsin-D expression in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 55:429-35, 1993.
 49. Joensuu H, Toikkanen S, Isola J. Stromal cell cathepsin D expression and long-term survival in breast cancer. *Br J Cancer* 71:155-159, 1995.
 50. Fontanini G, Pingitore R, Bigini D, et al. Growth fraction in non-small cell lung cancer estimated by proliferating cell nuclear antigen and comparison with ki-67 labelling and DNA flow cytometric data. *Am J Pathol* 141:1285-1290, 1992.
 51. Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, et al. p53 mutations and histological type of invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 53:4665-4669, 1993.
 52. Han S, Yun IJ, Noh DY, Choe KJ, Song SY, Chi JG. Abnormal expression of four novel molecular markers represents a highly aggressive phenotype in breast cancer. Immunohistochemical assay of p53, nm23, erbB-2, and cathepsin D protein. *J Surg Oncol* 65:22-27, 1997.