

Μελέτη της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2) σε διηθητικά καρκινώματα μαστού

Ε. Μυλωνά, Ι. Παπαδάκη, Ι. Γιαννοπούλου, Α. Καπράνου,
Σ. Μαρκάκη, Α. Κεραμόπουλος, Λ. Νακοπούλου

Study of cyclooxygenase-2 (COX-2) in invasive breast carcinoma

*E. Mylona, I. Papadaki, I. Giannopoulou, A. Kapranou, S. Markaki,
A. Keramopoulos, L. Nakopoulou*

*Department of Pathology, Medical School of Athens University and Alexandra Hospital,
Athens, Greece*

Introduction-Aim: Cyclooxygenase (COX) is the rate limiting enzyme that catalyzes the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. The inducible form, COX-2, is known to be overexpressed in breast cancer. Moreover, Peroxisome Proliferation-activated receptors γ (PPAR γ) are nuclear receptors, the activation of which has been related to a less malignant phenotype in various carcinomas.

In the present study, we examined the expression of COX-2 in invasive breast carcinomas and its correlation with the classic clinicopathological parameters, the disease-free and overall survival of the patient and the biological markers topoIIa, c-erbB-2, p53 and PPAR γ .

Materials and Methods: We applied immunohistochemistry on paraffin-embedded sections of 175 invasive breast carcinomas in order to detect the proteins COX-2, ER/PR, topoIIa, c-erbB-2, p53 and PPAR γ proteins. The results were elaborated by statistical analysis.

Results: COX-2 was inversely correlated with histological and nuclear grade ($p=0.039$ and $p<0.0001$ respectively) and positively with PR and ER ($p=0.016$ and $p=0.076$ respectively). COX-2 was also inversely associated with topoIIa ($p=0.033$) and p53 ($p=0.002$) and positively correlated with PPAR γ ($p<0.0001$), whereas inverse was found the correlation between COX-2 of tumor stromal cells and c-erbB-2. No correlation between COX-2 and patients' survival was found.

Conclusions: According to our results COX-2 is associated with a favourable prognostic phenotype, through its inverse correlation with the histological and nuclear grade, topoIIa, c-erbB-2, p53 and the parallel correlation with ER/PR and PPAR γ . However, as far as the patients' survival is concerned, no prognostic value

of COX-2 was found in the present study.

Key Words: Cyclooxygenase-2 (COX-2), PPAR γ , Immunohistochemistry, Breast cancer

Εισαγωγή-Σκοπός: Η κυκλοοξυγενάση (COX) είναι το ένζυμο-κλειδί στη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προσταγλαδίνες. Η κατ' επίκληση παραγόμενη, υπό την επίδραση μιτογόνων παραγόντων, COX-2 έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού. Επιπρόσδετα, οι υποδοχείς PPAR γ αποτελούν οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων, η ενεργοποίηση των οποίων έχει συνδεθεί με λιγότερο επιδεδικό φαινότυπο στα καρκινώματα.

Στην παρούσα μελέτη, ερευνήσαμε την έκφραση της COX-2 σε διηθητικά καρκινώματα μαστού και τη συσχέτιση αυτής με τις κλασικές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, την ελεύθερη νόσου και ολική επιβίωση των ασθενών και τους βιολογικούς δείκτες, *topoIIa*, *c-erbB-2*, *p53* και PPAR γ .

Υλικό-Μέθοδοι: Εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημική μέθοδος ABC/HPR σε τομές παραφίνης από 175 διηθητικά καρκινώματα μαστού, για την εντόπιση των πρωτεϊνών COX-2, ER/PR, *topoIIa*, *c-erbB-2*, *p53* και PPAR γ . Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση.

Αποτελέσματα: Το COX-2 συσχετίστηκε ανάστροφα με τον ιστολογικό και πυρηνικό βαθμό κακοηθείας ($p=0,039$ και $p<0,0001$ αντίστοιχα) και παράλληλα με τους PR και ER ($p=0,016$ και $p=0,076$ αντίστοιχα). Ανάστροφη ήταν επίσης η συσχέτιση με την *topoIIa* ($p=0,033$) και το *p53* ($p=0,002$) και παράλληλη με τους PPAR γ ($p<0,0001$). Ανάστροφη βρέθηκε η σχέση μεταξύ της COX-2 των στρωματικών κυττάρων και της *c-erbB-2*. Δεν βρέθηκε σχέση μεταξύ της έκφρασης του COX-2 και της επιβίωσης των ασθενών.

Συμπεράσματα: Από τα ευρήματα της μελέτης συμπεραίνεται ότι η COX-2 συσχετίζεται με ευνοϊκό προγνωστικό φαινότυπο, μέσω της ανάστροφης σχέσης της με τον πυρηνικό και ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, την *topoIIa*, το *c-erbB-2*, το *p53*, καθώς και την παράλληλη συσχέτιση με τους ER/PR και PPAR γ , χωρίς ωστόσο να αποδεικνύεται η προγνωστική της σημασία για την επιβίωση των ασθενών.

Λέξεις Κλειδιά: Κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2), υποδοχείς που προκαλούν υπερπλασία των υπεροξυσωμάτων (PPAR γ), ανοσοϊστοχημεία, καρκίνος μαστού

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η κυκλοοξυγενάση (COX) αποτελεί το κυριότερο ένζυμο της οδού μετατροπής του αραχιδονικού οξέος στις προσταγλαδίνες (PG). Έχουν αναγνωριστεί δύο ισότυποι του ενζύμου, η COX-1 που παράγεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς συμμετέχοντας στη φυσιολογική τους λειτουργία και η COX-2 που παράγεται μόνο κατ' επίκληση, μετά την επίδραση παραγόντων όπως οι κυτοκίνες, οι ενδοτοξίνες, οι αυξητικοί παράγοντες και τα μιτογόνα¹.

Οι προσταγλαδίνες ασκούν τη δράση τους είτε συνδεόμενες σε υποδοχείς της επιφανείας

των κυττάρων², είτε δρώντας σε μια οικογένεια πυρηνικών υποδοχέων, τους υποδοχείς που προκαλούν υπερπλασία στα υπεροξυσώματα (PPARs) και ειδικά τον PPAR γ ³. Αυτός, μετά τον ετεροδιμερισμό του με τον υποδοχέα X των ρετινοειδών, συνδέεται σε ειδική περιοχή του υποκινητή διαφόρων γονιδίων και ρυθμίζει τη μεταγραφή τους⁴. Επίσης, οι προσταγλαδίνες, εκτός από την αυτοκρινή δράση στα κύτταρα που τις παράγουν, ασκούν και παρακρινή δράση στα παρακείμενα κύτταρα⁵.

Είναι πολλά τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η COX-2 παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου στο μαστό. Η

παρουσία αυξημένων επιπέδων PGE₂, του κυριότερου προϊόντος της COX-2, έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη καρκινώματος στο μαστό, με μεταστατικό δυναμικό και επιθετικό φαινότυπο⁶, ενώ πειράματα σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι τα ζώα που είχαν τη δυνατότητα να εκφράζουν το γονίδιο της COX-2 παρουσίαζαν υψηλότερα ποσοστά καρκίνου στο μαστό σε σχέση με τα ζώα στα οποία το COX-2 γονίδιο είχε απενεργοποιηθεί⁷.

Οι υποδοχείς PPAR γ , επίσης εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού και μάλιστα έχει δείξει, από πειράματα σε κυτταρικές σειρές ότι η ενεργοποίησή τους αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προκαλεί την ανάδυση λιγότερο κακοήδους φαινοτύπου στα καρκινικά κύτταρα⁸. Επίσης, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι οι αγωνιστές των PPAR γ υποδοχέων αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού, τόσο *in vitro*, όσο και σε πειραματόζωα⁹.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης COX-2 σε μια σειρά από διηθητικά καρκινώματα μαστού και τη συσχέτιση της έκφρασης αυτής με τις γνωστές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, την επιβίωση των ασθενών, τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού *topoIIa*, την ογκοπρωτεΐνη *c-erbB-2*, την πρωτεΐνη *p53* και τον υποδοχέα PPAR γ .

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στη μελέτη περιλήφθησαν 175 ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα μαστού. Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 25 έως 86 χρόνια (μέση ηλικία 56,7 \pm 12,8). Καμία ασθενής δεν είχε λάβει χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία προεγχειρητικά. Όλα τα καρκινώματα ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια της WHO¹⁰ και χαρακτηρίστηκαν ως πορογενή ή λοβιακά. Ο ιστολογικός και πυρηνικός βαθμός κακοηθείας των πορογενών καρκινωμάτων αξιολογήθηκε σύμφωνα με τα κριτήρια Scarff, Bloom και Richardson¹¹. Η σταδιοποίηση της νόσου έγινε σύμφωνα με το σύστημα TNM.

Μετά τη χειρουργική επέμβαση οι ασθενείς παρακολουθούνταν κάθε 6 μήνες για μια μέση περίοδο 111 μηνών (από 5-135 μήνες).

Για την ανοσοϊστοχημική διερεύνηση ελήφθησαν τομές παραφίνης πάχους 5 μ m. Ακολούθησε επώαση στους 60 °C για 1/2 ώρα και αποπαραφίνωση. Στη συνέχεια έγινε αποκάλυ-

ψη των αντιγονικών επιτόπων με χρήση φούρνου μικροκυμάτων, δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης και των μη ειδικών αντιγονικών δέσεων. Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 4 °C με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης COX-2 σε αραιώση 1: 120 (Santa Cruz, Biotechnology, Calif., USA). Οι λοιποί δείκτες που εκτιμήθηκαν στην παρούσα μελέτη, σε σχέση με την COX-2, είχαν μελετηθεί στο παρελθόν και τα αποτελέσματα βρίσκονται σε βάση δεδομένων.

Ακολούθησε επώαση των τομών με το σύμπλεγμα αβιδίνης- βιοτίνης-υπεροξειδάσης (ABC/HRP). Η αντίδραση υπεροξειδάσης ανιχνεύθηκε με διαμινοβενζιδίνη (DAB) ως χρωμογόνο υπόστρωμα και ακολούθησε χρώση με αιματοξυλίνη.

Τα δείγματα αξιολογήθηκαν από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές. Ως δετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές που ήταν γνωστό ότι παρουσίαζαν ανοσοαντίδραση COX-2, ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες τομές στις οποίες το πρωτογενές αντίσωμα παραλείφθηκε και αντικαταστάθηκε από TBS. Το ποσοστό των COX-2 δετικών κυττάρων ανα περίπτωση προέκυψε από την εξέταση 10 οπτικών πεδίων σε μεγέθυνση X400 μιας τομής από κάθε δείγμα. Η χρώση ανιχνεύθηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων και στα κύτταρα του στρώματος του όγκου.

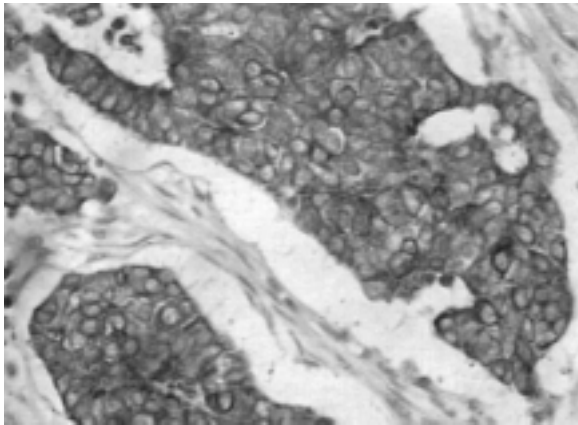
Μετά από διάφορες στατιστικές δοκιμές για να καθοριστούν οι τιμές εκείνες που επιτρέπουν τις καλύτερες δυνατές συσχετίσεις μεταξύ των διαφόρων μελετώμενων παραμέτρων, τα "cut off" ορίστηκαν ως εξής: α) Αρνητική χαρακτηρίστηκε η COX-2 κυτταροπλασματική χρώση όταν αφορούσε ποσοστό \leq 20% και θετική όταν αφορούσε ποσοστό $>$ 20% των καρκινικών κυττάρων. β) Όσον αφορά τα στρωματικά κύτταρα, οι περιπτώσεις με χρώση σε ποσοστό \leq 10% των εξεταζομένων στρωματικών κυττάρων θεωρήθηκαν αρνητικές, ενώ θετικές όταν ανιχνευόταν χρώση σε ποσοστό $>$ 10% των στρωματικών κυττάρων. Όσον αφορά το PPAR γ , ανιχνεύθηκε κυρίως στο κυτταρόπλασμα και ως "cut off" ορίστηκε το 5%. Έτσι, όταν η κυτταροπλασματική χρώση ανιχνευόταν σε ποσοστό \leq 5% των καρκινικών κυττάρων θεωρήθηκε αρνητική, αν σε ποσοστό $>$ 5% των κυττάρων, θετική.

Για τη στατιστική μελέτη χρησιμοποιήθηκε μέθοδος Pearsons' chi-square για την αξιολόγηση της COX-2 σε σχέση με τις λοιπές παρα-

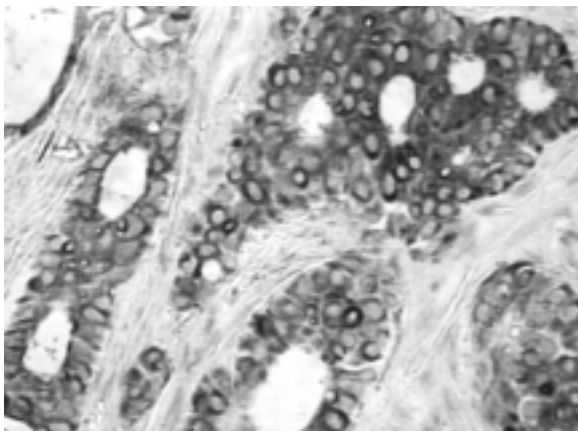
μέτρους. Για τη μονοπαραγοντική μελέτη της επιβίωσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος log-rank test, ενώ για την πολυπαραγοντική η μέθοδος cox regression.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανοσοϊστοχημική έκφραση του COX-2 παρατηρήθηκε σε 119 από τα 175 διηθητικά καρκινώματα του μαστού. Η χρώση ήταν ετερογενής. Εντοπιζόταν κυρίως στο κυτταρόπλασμα (66,9%) (Εικ. 1), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε αυξημένη ένταση χρώσης στην περιπυρηνική (Εικ. 2) και υπομεμβρανική περιοχή (Εικ. 3). Σε 81 περιπτώσεις (46,3%) ανιχνεύθηκε χρώση στα στρωματικά κύτταρα του



Εικόνα 1. Κυτταροπλασματική χρώση της COX-2 σε πορογενές καρκίνωμα μαστού (ABC/HPR X400).

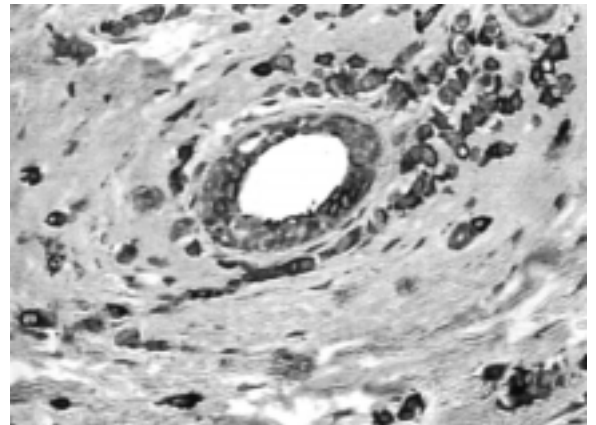


Εικόνα 2. Θετική χρώση της COX-2 κυρίως στην περιπυρηνική περιοχή των καρκινικών κυττάρων του μαστού (ABC/HPR X400).

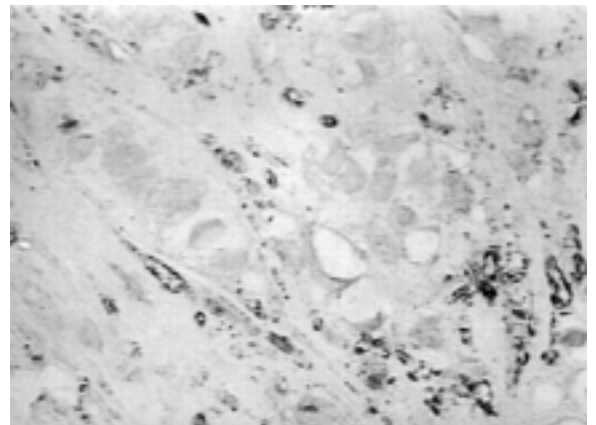
όγκου (Εικ. 4).

Η έκφραση της COX-2 συσχετίστηκε ανάστροφα με τον πυρηνικό (Εικ. 5α) και ιστολογικό βαθμό κακοηθείας του όγκου (Εικ. 5β) ($p < 0.0001$ και $p = 0,039$ αντίστοιχα). Δε βρέθηκε καμιά συσχέτιση μεταξύ της COX-2 και κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων όπως η εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, το μέγεθος του όγκου, ο ιστολογικός τύπος, οι λεμφαδενικές μεταστάσεις ή το στάδιο της νόσου.

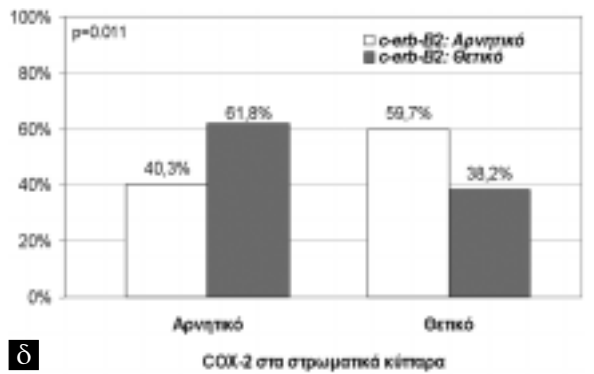
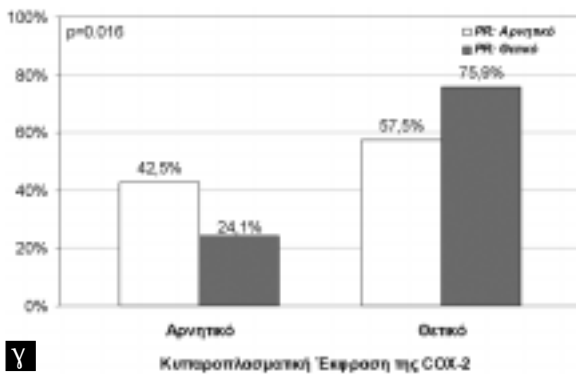
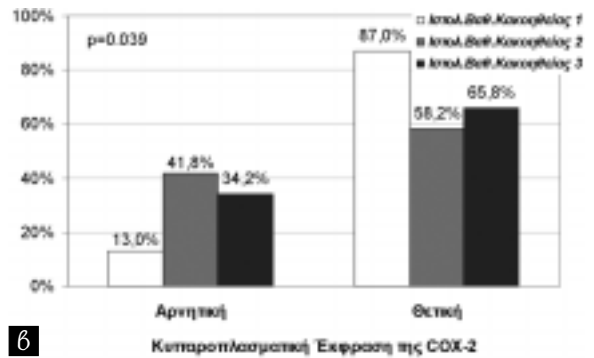
Όσον αφορά τους υπόλοιπους βιολογικούς δείκτες, η COX-2 συσχετίστηκε παράλληλα με τους ορμονικούς υποδοχείς PR/ER (Εικ. 5γ) ($p = 0,016$ και $p = 0,076$ αντίστοιχα), ενώ η σχέση



Εικόνα 3. Υπομεμβρανική COX-2 χρώση σε λοβιακό καρκίνωμα μαστού. Μικρού βαθμού χρώση διακρίνεται επίσης στο φυσιολογικό επιθήλιο ενός πόρου (ABC/HPR X400).



Εικόνα 4. Ανοσοεντόπιση της COX-2 πρωτεΐνης στα κύτταρα του στρώματος ενός πορογενούς καρκινώματος του μαστού (ABC/HPR X400).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της κυτταροπλασματικής έκφρασης της COX-2 στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τις κλασικές παραμέτρους: Πυρηνικό βαθμό κακοηθείας (α), ιστολογικό βαθμό κακοηθείας (β), PR (γ) και της έκφρασης της COX-2 στα στρωματικά κύτταρα του όγκου με την c-erbB-2 (δ).

με την *toroIIa* (Εικ. 6α) και την *p53* (Εικ. 6β) αναδείχθηκε ανάστροφη ($p=0,033$ και $p=0,002$ αντίστοιχα). Η COX-2 συσχετίστηκε παράλληλα με την έκφραση του PPAR γ (Εικ. 6γ) ($p<0,0001$), ενώ το c-erbB-2 βρέθηκε να σχετίζεται ανάστροφα με την έκφραση της COX-2 στα στρωματικά κύτταρα του όγκου (Εικ. 5δ) ($p=0,011$). Όλες οι παραπάνω συσχετίσεις φαίνονται στον πίνακα 1.

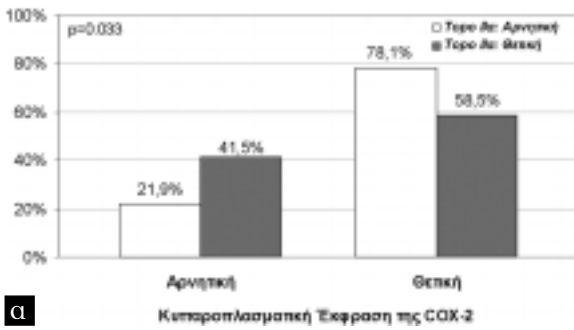
Δε βρέθηκε συσχέτιση με την επιβίωση των ασθενών στη μονοπαραγοντική ή πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση. Οι σημαντικότεροι ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες για την ελεύθερη νόσου επιβίωση ήταν το μέγεθος του όγκου και οι λεμφαδενικές μεταστάσεις ($p=0,004$ και $p=0,008$ αντίστοιχα) ενώ για την ολική επιβίωση ήταν το στάδιο της νόσου και η *toroIIa* ($p=0,001$ και $p=0,049$ αντίστοιχα).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

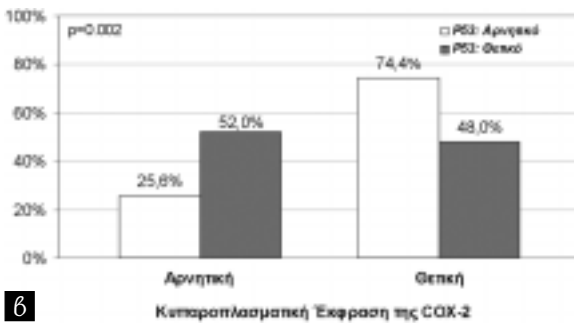
Στην παρούσα μελέτη ερευνήσαμε την έκ-

φραση της COX-2 πρωτεΐνης σε 175 διηθητικά καρκινώματα μαστού και την ανιχνεύσαμε συχνότερα στα καρκινώματα με ευνοϊκά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη που ερευνά την ανοσοϊστοχημική έκφραση του PPAR γ σε σχέση με την COX-2 σε καρκινώματα μαστού.

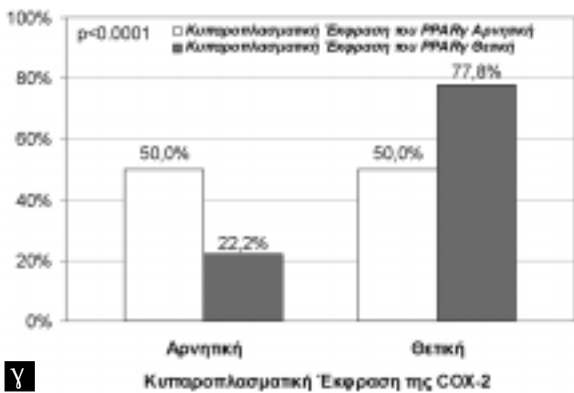
Η κυτταροπλασματική χρώση της COX-2 ανιχνεύτηκε στο 66,9% των καρκινωμάτων της δικής μας σειράς. Ωστόσο, έχει ανιχνευτεί σε διηθητικά καρκινώματα μαστού και από άλλους ερευνητές σε ποσοστά που ποικίλλουν από 17 ως 72%¹²⁻¹⁸. Αυτή η ασυμφωνία όσον αφορά τα ποσοστά έκφρασης της COX-2 μπορεί να αποδοθεί στα διαφορετικά αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και στο διαφορετικό τρόπο αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής χρώσης μεταξύ των ερευνητικών ομάδων. Επίσης, στην παρούσα μελέτη ανιχνεύτηκε COX-2 χρώση σε σημαντικό ποσοστό των στρωματικών κυττάρων του όγκου (46,3%), καθώς και στο φυσιολογικό επιθήλιο



α



β



γ

Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της κυτταροπλασματικής έκφρασης της COX-2 στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με νεότερους βιολογικούς δείκτες: torοIIa (α), p53 (β) και PPARγ (γ).

παραπλεύρως του όγκου, όπου αυτό υπήρχε, παρατήρηση που έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές^{13,18}. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να είναι ενδεικτικό της παρακρινούς δράσης των προσταγλαδινών, με αποτέλεσμα αυτές να μη δρουν μόνο στα καρκινικά κύτταρα που τις παράγουν μέσω της οδού της COX-2, αλλά και στα παρακείμενα στρωματικά και φυσιολογικά κύτταρα, ρυθμίζοντας τη συνεργασία μεταξύ κακοήθων και γειτονικών, μη νεοπλασματικών κυττάρων⁵.

Η COX-2 συσχετίστηκε ανάστροφα με τον

πυρηνικό και ιστολογικό βαθμό κακοήθειας ($p < 0,0001$ και $p = 0,039$ αντίστοιχα), καταδεικνύοντας για πρώτη φορά τη συσχέτισή της με καλές προγνωστικές παραμέτρους στον καρκίνο του μαστού. Τα παραπάνω έρχονται σε αντίθεση με τα ευρήματα άλλων ερευνητών^{14,15,17}, όμως είτε ο μικρός αριθμός περιστατικών¹⁴, είτε η διαφορά στη χρησιμοποιούμενη μέθοδο και τα "cut off"^{14,15,17}, καθιστούν δύσκολη τη σύγκριση των άλλων μελετών με τη δική μας. Εξάλλου, η παράλληλη σχέση της COX-2 με τους υποδοχείς ER και PR ($p = 0,076$ και $p = 0,016$ αντίστοιχα) ενισχύει την προαναφερόμενη συσχέτισή της με έναν λιγότερο κακοήδη φαινότυπο.

Η συσχέτιση της COX-2 με τον καλό προγνωστικό φαινότυπο των καρκινωμάτων του μαστού ισχυροποιείται από την ευρεθείσα αντίστροφη σχέση της με την torοIIa ($p = 0,033$), έναν δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την p53 ($p = 0,002$), μια πρωτεΐνη που, στη μεταλλαγμένη μορφή στην οποία ανιχνεύεται ανοσοϊστοχημικά, αδυνατεί να οδηγήσει το κύτταρο στην απόπτωση. Με άλλα λόγια, φαίνεται ότι, κάτω από ορισμένες συνθήκες, η έκφραση της COX-2 μπορεί να μη σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά με την απόπτωση των κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά ενισχύονται από το γεγονός ότι μέλη της οικογένειας των COX-2 παραγόμενων προσταγλαδινών, όπως η PGA_2 και D_2 έχουν εμπλακεί στη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων και όχι στον πολλαπλασιασμό τους^{18,19} και φυσικά, δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε τις συνθήκες που καθορίζουν την κατεύθυνση που λαμβάνει κάθε φορά η παραγωγή των προσταγλαδινών, δια της οδού της COX-2, μέσα στο κύτταρο. Σε μια πρόσφατη έρευνα οι Ristimäki και συν.¹⁷ χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των ιστικών συστοιχιών (tissue microarrays), κατέληξαν στον παράλληλο συσχετισμό της COX-2 με το Ki67, έναν άλλον δείκτη πολλαπλασιασμού, και την p53. Η διαφορά αυτή από τα δικά μας ευρήματα μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική μέθοδο των δύο εργασιών, δεδομένου ότι η COX-2 χρώση είναι ετερογενής και η μέθοδος των ιστικών συστοιχιών εξετάζει μικρής έκτασης ιστό. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να λάβουμε υπ' όψη μας ότι η torοIIa θεωρείται πιο αξιόπιστος δείκτης από την Ki67 στην εκτίμηση του αριθμού των μιτωτικά ενεργών κυττάρων²⁰.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της COX-2 στα στρωματικά κύτταρα του όγκου συσχετίστηκε

Πίνακας 1. Η έκφραση της COX-2 στα καρκινικά και στρωματικά κύτταρα και η συσχέτισή της με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους και βιολογικούς δείκτες.

		Σύνολο	Κυτταροπλασματική έκφραση Cox (Θετική)			Cox Στρωματικών κυττάρων (Θετική)		
			N	%	p-value	N	%	p-value
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση	Πρίν	58	40	69,0%	NS	23	39,7%	NS
	Μετά	117	77	65,8%		58	49,6%	
Ιστολογικός τύπος	Πορογενές	140	91	65,0%	NS	67	47,9%	NS
	Λοβιακό	33	26	78,8%		13	39,4%	
Ιστολογικός βαθμός κακοηθείας	1	23	20	87,0%	0,039	13	56,5%	NS
	2	79	46	58,2%		38	48,1%	
	3	38	25	65,8%		16	42,1%	
Πυρηνικός βαθμός κακοηθείας	1	62	52	83,9%	<0,0001	26	41,9%	NS
	2	60	41	68,3%		30	50,0%	
	3	51	24	47,1%		24	47,1%	
Μέγεθος όγκου	<2 cm	43	28	65,1%	NS	18	41,9%	NS
	2-5cm	103	73	70,9%		50	48,5%	
	≥5 cm	25	14	56,0%		11	44,0%	
LN	Μη-διηθημένοι	71	44	62,0%	NS	30	42,3%	NS
	Διηθημένοι	101	72	71,3%		50	49,5%	
Στάδιο Νόσου	1	33	19	57,6%	NS	15	45,5%	NS
	2	111	78	70,3%		54	48,6%	
	3	28	19	67,9%		11	39,3%	
ER	Αρνητικό	81	48	59,3%	NS	40	49,4%	NS
	Θετικό	93	68	73,1%		40	43,0%	
PR	Αρνητικό	87	50	57,5%	0,016	44	50,6%	NS
	Θετικό	87	66	75,9%		36	41,4%	
Τοπο IIa	Αρνητικό	96	75	78,1%	0,033	41	42,7%	NS
	Θετικό	41	24	58,5%		18	43,9%	
p53	Αρνητικό	121	90	74,4%	0,002	50	41,3%	NS
	Θετικό	50	24	48,0%		28	56,0%	
c-erb-B2	Αρνητικό	62	37	59,7%		37	59,7%	0,011
	Θετικό	110	78	70,9%		42	38,2%	
PPARγ	Αρνητικό	68	34	50,0%	<0,0001	34	50,0%	NS
	Θετικό	99	77	77,8%		45	45,5%	

ανάστροφα με την ογκοπρωτεΐνη c-erbB-2 των καρκινικών κυττάρων. Αυτή η συσχέτιση θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι ενισχύει την ιδέα της συνεργασίας των καρκινικών κυττάρων και του στρώματος, πιθανόν μέσω της παρακρινούς δράσης των προσταγλαδινών⁵.

Η ανωτέρω αναφερόμενη συσχέτιση της COX-2 με καλές προγνωστικές παραμέτρους ισχυροποιείται από την παράλληλη σχέση της με τους υποδοχείς PPARγ ($p < 0,0001$). Η παράλληλη αυτή σχέση δικαιολογείται από τα ευρήματα άλλης έρευνας που υποστηρίζει την ανίχνευση της ειδικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας πάνω στην οποία δρουν οι PPARγ, στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της

COX-2²¹. Έτσι, φαίνεται ότι οι υποδοχείς PPARγ, αφού συνδεθούν με τους κατάλληλους προσδέτες, προσδέονται στην προαναφερόμενη ειδική αλληλουχία και αυξάνουν τη μεταγραφή του COX-2 γονιδίου και ακολούθως, την έκφραση της COX-2 πρωτεΐνης²². Όπως έχουμε ήδη αναφέρει η ενεργοποίηση των PPARγ υποδοχέων έχει συνδεθεί με την εμφάνιση ενός λιγότερο κακοήδους φαινοτύπου σε κυτταρικές σειρές καρκίνου μαστού⁸. Θα μπορούσαμε λοιπόν να πούμε ότι η παρατηρούμενη συσχέτιση της COX-2 με δείκτες καλής προγνωστικής αξίας στην παρούσα μελέτη συνάδει με την ευρεθείσα παράλληλη σχέση της COX-2 με τους υποδοχείς PPARγ.

Στη μελέτη αυτή δε βρήκαμε καμία συσχέτιση μεταξύ της COX-2 και την ελεύθερη νόσου ή ολική επιβίωση των ασθενών. Όσον αφορά τους άλλους ερευνητές, ούτε οι Ristimaki και συν.¹⁷, ούτε οι Denkert και συν.¹⁴ ανέδειξαν την COX-2 ως ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για την επιβίωση των ασθενών. Οι Costa και συν.¹⁶ εξάλλου, που βρήκαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της COX-2 και της μείωσης της ελεύθερης νόσου επιβίωσης των ασθενών, στην πολυπαραγοντική ανάλυση, έχουν συμπεριλάβει στην έρευνά τους έναν εξαιρετικά μικρό αριθμό περιστατικών (26 περιπτώσεις).

Συνοψίζοντας, η αυξημένη κυτταροπλασματική έκφραση της COX-2 πρωτεΐνης στα διηθητικά καρκινώματα μαστού που μελετήσαμε συσχετίστηκε με έναν λιγότερο επιθετικό φαινότυπο του όγκου, όπως φάνηκε από την αναστροφή σχέση της COX-2 με τον πυρηνικό και ιστολογικό βαθμό διαφοροποίησης, την *topoIIa*, το *p53* και το *c-erbB-2*. Η συσχέτιση αυτή ισχυροποιείται από την παράλληλη σχέση της COX-2 με την έκφραση των υποδοχέων PPAR γ . Τα ανωτέρω στοιχεία καταδεικνύουν την ανάγκη για περισσότερη έρευνα, σε μεγαλύτερες σειρές ασθενών, του ρόλου της COX-2 στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων καθώς και την επιβίωση των ασθενών, ιδιαίτερα αν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν οι εκλεκτικοί COX-2 αναστολείς σαν θεραπευτική επιλογή στις ασθενείς με καρκίνωμα του μαστού.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Στην παρούσα εργασία απονεμήθηκε το βραβείο "Ουρανία Αναστασιάδου" με χορηγό το Γενικό Κρατικό Νοσοκομείο Αθηνών, στο 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Παθολογικής Ανατομικής που έγινε στην Καβάλα, 24-26 Ιουνίου 2004.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vane JR, Bakhle VS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Toxicol* 38:97-120, 1988.
2. Shuh Narumiya, Garret AF. Genetic and pharmacological analysis of prostainoid receptor function. *J Clin Invest* 108:25-30, 2001.
3. Hyunjung Lim, Sunahansu KD. Minireview. A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors. *Endocrinology* 143(9):3207-3210, 2002.
4. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Hey-

man RA, Evans RH. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358:771-774, 1992.

5. Vang Cao, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol* 190:279-286, 2002.
6. Fulton AM, Zhang SZ, Chong YC. Role of the prostaglandin E₂ receptor in mammary tumor metastasis. *Cancer Res* 51:2047-2050, 1991.
7. Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 276(18): 563-569, 2001.
8. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KI, Zhang M et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Mol Cell* 1:465-470, 1998.
9. Elster E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8805-8811, 1998.
10. WHO: Histological typing of breast tumors. In Hartman WH, Uzello L, Sobin LH, Stalberg H. *International Histological Classification of Tumors*. Geneva, World Health Organization pp. 15-25, 1981.
11. Robins P, Pinder S, DeKlerk N. Histological grading of breast carcinomas: A study of interobserved agreement. *Hum Pathology* 28:873-879, 1995.
12. Parrett KL, Harris RL, Rush D. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol* 10:503-508, 1997.
13. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicropo FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 62:1676-81, 2002.
14. Denkert G, Winzer KJ, Muller BM, Weichert W, Pest S, Kobel M et al. Elevated expression of cyclooxygenase-2 is a negative prognostic factor of disease free survival and overall survival in patients with breast carcinoma. *Cancer* 97:2978-87, 2003.
15. Shim JY, An HJ, Lee YH, Kim SK, Lee KP, Lee KS. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma and its poor prognostic factors. *Mod Pathol* 16(12):1199-1204, 2003.
16. Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclooxygenase-2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast can-

- cer. *J Clin Pathol* 55:429-34, 2002.
17. Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 62:632-635, 2002.
 18. Soslow R, Dannenberg A, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors. *Cancer* 89:2637-45, 2000.
 19. Brueggemeier RW, Quinn AL, Parrett ML, Joarder FS, Harris RE, Robertson FM. Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. *Cancer Lett* 140:27-35, 1999.
 20. Clay CF, Namen AM, Atsumi G, Willingham MC, High KP, Kute TE et al. Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 20:1905-11, 1999.
 21. Lynch BJ, Guinee DG JY, Holen JA. Human DNA topoisomerase II α : a new marker of cell proliferation in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 28:1180-1188, 1997.
 22. Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 274(12):8328-8334, 1999.

Corresponding author:

L. Nakopoulou,
Professor in Pathology, Department of Pathology,
School of Medicine, National and Kapodistrian
University of Athens,
75 Mikras Asias str., Goudi, GR-11527 Athens, Greece
Tel.: +30210-7462116, Fax: +30210-7462157
e-mail: lnakopou@cc.uoa.gr

Υπεύθυνη αλληλογραφίας:

Λυδία Νακοπούλου,
Καθηγήτρια Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής,
Ιατρική Σχολή Παν/μίου Αθηνών
Μικράς Ασίας 75, 115 27 Αθήνα
Τηλ. 210-7462116, Fax: 210-7462157
e-mail: lnakopou@cc.uoa.gr