

## Συγκριτική μελέτη της έκφρασης του EGFR σε πρωτεϊνικό και γονιδιακό επίπεδο με ανοσοϊστοχημεία και FISH σε καρκινώματα του παχέος εντέρου

Μπόμπος Μ., Κωστόπουλος Ι., Παπαδημητρίου Σ.Κ., Βρεττού Ε.

### *Comparative study of EGFR protein and gene expression using IHC and FISH in colon carcinomas*

Bobos M., Kostopoulos I., Papadimitriou S.C., Vrettou E.

Department of Pathology, Aristotle University Medical School, Thessaloniki, Greece

**Introduction-Aim:** Colorectal cancer is one of the leading causes of cancer related-deaths worldwide. EGFR glycoprotein is frequently expressed in colorectal carcinomas and recent research is focused on its prognostic and therapeutic implications. There are few data on the correlation of EGFR protein expression and gene status in colorectal carcinomas. In the present study we evaluated the correlation of EGFR protein expression with EGFR gene numerical aberrations in colorectal carcinomas.

**Materials and Methods:** We investigated 61 colorectal carcinomas for EGFR expression with immunohistochemistry and EGFR gene and chromosome 7 status using EGFR Spectrum Orange/CEP7 Spectrum Green probes by fluorescent in situ hybridization (FISH).

**Results:** EGFR protein expression was detected in 33/61 cases (54%) and over-expression (2+, 3+) in 11/33 cases. EGFR/CEP7 ratio ranged from 0.86-8.11 with a mean of 1.17. High level amplification (EGFR/CEP7 ratio >2) of EGFR gene was observed in one IHC EGFR negative case, whereas low level amplification (EGFR/CEP7 ratio >1.3-2) in 2 cases (EGFR 1+, EGFR-). Increased EGFR gene signals were found in 24/61 (39%) cases, while gene indeterminate or definitive loss was not detected. CEP7 gain was calculated in 13 cases, indeterminate loss in 4 cases and definitive loss in 1 case. Polyploidy and polysomy were observed in 10 and 4 cases, respectively. EGFR gene amplification was found only in low-grade carcinomas with high pathologic stage (C2) and advanced clinical stage (TNM stage III). EGFR gene copy gain was detected in low and high grade tumors of early and advanced clinical stage (II-IV).

**Conclusions:** EGFR immunohistochemical expression was independent of gene status. The detected EGFR gene amplification in negative for protein expression cases suggests that FISH method may be useful in cases where the production of EGFR protein is absent.

**Key words:** Colon carcinoma, EGFR, FISH, immunohistochemistry.

**Εισαγωγή-Σκοπός:** Ο ορθοκολικός καρκίνος αποτελεί ένα από τα πιο συχνά κακοήγη νεοπλάσματα παγκοσμίως. Ο EGFR υποδοχέας εκφράζεται συχνά στον ορθοκολικό καρκίνο και αποτελεί αντικείμενο έρευνας τόσο σε προγνωστικό όσο και σε θεραπευτικό επίπεδο. Οι εργασίες σχετικά με τη μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του EGFR και την εκτίμηση των αντιγράφων (ενίσχυση) του αντίστοιχου γονιδίου με FISH στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου είναι σπάνιες. Ως εκ τούτου προέκυψε ο σχεδιασμός της παρούσας εργασίας με σκοπό τη συγκριτική μελέτη της έκφρασης του EGFR σε επίπεδο πρωτεΐνης με ανοσοϊστοχημεία και του γονιδίου σε επίπεδο DNA με FISH σε μία σειρά καρκινωμάτων παχέος εντέρου.

**Υλικό-Μέθοδος:** Αρχειακό υλικό από 61 περιπτώσεις καρκινωμάτων παχέος εντέρου μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά με τη μέθοδο στρεπταβιδίνης-βιοτίνης ως προς την έκφραση του EGFR. Με τη μέθοδο FISH και χρησιμοποιώντας το σύμπλεγμα ιχνηθετών EGFR Spectrum Orange/CEP7 Spectrum Green διερευνήθηκε η κατάσταση του EGFR γονιδίου (EGFR gene status) καθώς και ενδεχόμενες άλλες αριθμητικές χρωμοσωμικές διαταραχές. Επιπρόσθετα αναλύθηκαν τα αποτελέσματα και ως προς τα ιστολογικά και κλινικά δεδομένα.

**Αποτελέσματα:** Ανοσοϊστοχημική έκφραση του EGFR παρατηρήθηκε σε 33/61 (54%) περιπτώσεις, ενώ υπερέκφραση (2+, 3+) σε 11 από αυτές. Ο λόγος EGFR/CEP7 κυμάνθηκε από 0,86-8,11 με μέσο όρο 1,17. Υψηλού βαθμού ενίσχυση του EGFR γονιδίου (λόγος EGFR/CEP7 >2) ανευρέθηκε σε μία περίπτωση (EGFR-), ενώ χαμηλού βαθμού ενίσχυση (λόγος EGFR/CEP7 >1,3-2) σε 2 (EGFR 1+, EGFR-) περιπτώσεις. Επαύξηση του EGFR γονιδίου εμφάνισαν 24 (39%) περιπτώσεις. Μερική ή ολική απώλεια του EGFR γονιδίου δεν παρατηρήθηκε. Επαύξηση του CEP7 παρουσίασαν 13 περιπτώσεις, ενώ μερική απώλεια 4 και ολική απώλεια 1 περίπτωση. Πολυπλοειδία εμφάνισαν 10 και πολυσωμία 4 περιπτώσεις. Ενίσχυση του EGFR γονιδίου βρέθηκε μόνο σε νεοπλάσματα χαμηλής κακοήθειας, υψηλού ιστολογικού σταδίου (C2) και προχωρημένου κλινικού σταδίου (III), ενώ επαύξηση του γονιδίου EGFR διαπιστώθηκε και σε καρκινώματα υψηλής κακοήθειας, με ή χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις, αρχόμενου ή και προχωρημένου κλινικού σταδίου (II-IV).

**Συμπεράσματα:** Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του EGFR ήταν ανεξάρτητη της γονιδιακής ενίσχυσης ή επαύξησης καθώς και των υπόλοιπων χρωμοσωμικών διαταραχών. Η ενίσχυση του γονιδίου EGFR που παρατηρήθηκε σε περιπτώσεις με αρνητική ανοσοχρώση δείχνει ότι η μέθοδος FISH μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανάδειξη περιπτώσεων με αναστολή/απώλεια της έκφρασης του EGFR υποδοχέα.

**Λέξεις κλειδιά:** Ανοσοϊστοχημεία, FISH, EGFR, καρκίνωμα παχέος εντέρου

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ορθοκολικό καρκίνωμα αποτελεί μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου τόσο στις

ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Παγκοσμίως, είναι το τέταρτο πιο συχνό κακοήθες νεόπλασμα με πάνω από 1.000.000 νέες περιπτώσεις το χρόνο και αντίστοιχα

>500.000 περίπου θανάτους<sup>1</sup>. Αν και η χειρουργική εξαίρεση του όγκου αποτελεί την πρώτη θεραπευτική επιλογή, αρκετοί ασθενείς εμφανίζουν υποτροπές και καταλήγουν λόγω της νόσου. Η ακτινοθεραπεία έχει χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική θεραπευτική αγωγή χωρίς όμως να βελτιώσει την επιβίωση<sup>2</sup>. Βασικό όπλο στη θεραπεία του ορθοκολικού καρκίνου αποτελεί η χημειοθεραπευτική αγωγή.

Τα τελευταία χρόνια η ραγδαία εξέλιξη της βιολογίας και των βασικών επιστημών γενικότερα οδήγησε στην ανακάλυψη και αποσαφήνιση κυτταρικών οδών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της νεοπλασίας, στην επιβίωση ή στην απόπτωση και στη μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων. Επιπρόσθετα αναγνωρίστηκαν σε νεοπλασματικούς ιστούς μόρια τα οποία αποτελούν στόχους ειδικής θεραπείας. Σήμερα, ένα από τα πολλά υποσχόμενα μόρια στόχους στη θεραπεία του ορθοκολικού και όχι μόνο καρκίνου αποτελεί ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor-EGFR).

Ο EGFR (HER-1) είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη και ειδικότερα μια τυροσινική κινάση, μέλος της οικογένειας HER, η οποία εμπλέκεται σε πληθώρα κυτταρικών οδών που επηρεάζουν την κυτταρική αύξηση ήτοι τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο<sup>3</sup>. Έχει αποδειχθεί ότι η υπερενεργοποίηση του EGFR από ειδικούς προσδέτες παίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση λόγω της επίδρασης του σε βασικές κυτταρικές οδούς όπως της Akt/PKB κινάσης, της MAPK/ERK κινάσης, του STAT και άλλων. Η υπερέκφραση του EGFR έχει συσχετισθεί επίσης με χαμηλό προσδόκιμο επιβίωσης σε συμπαγείς όγκους<sup>4,5</sup>, ενώ στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου η προγνωστική αξία του EGFR δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική<sup>6</sup>.

Η υπερέκφραση του EGFR και ο ενεργός του ρόλος σε σημαντικότερες κυτταρικές λειτουργίες οδήγησε στη δημιουργία χημικών μονοκλωνικών αντισωμάτων που στοχεύουν στο εξωκυττάριο τμήμα του EGFR (cetuximab, panitumumab) με αποτέλεσμα την αναστολή σύνδεσης με τους προσδέτες, καθώς και αναστολέων της τυροσινικής δράσης του ενδοκυττάριου τμήματος του EGFR μορίου (erlotinib, gefitinib). Σε πρόσφατη μελέτη φαίνεται ότι η μονοθεραπεία με cetuximab (Erbix<sup>TM</sup>) ή ο συνδυασμός με irinotecan σε ασθενείς με

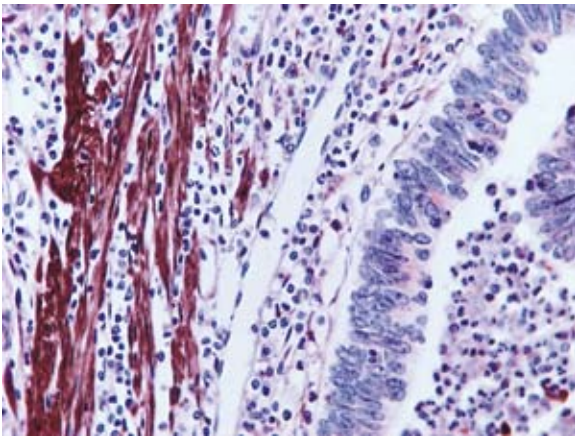
ανθεκτικό στην irinotecan καρκίνωμα παχέος εντέρου βελτίωσε την επιβίωση και την εξέλιξη της νόσου<sup>7</sup>.

Στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου η ανοσοϊστοχημική έκφραση του EGFR εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις (41%→80%)<sup>8-11</sup> και φαίνεται να μην σχετίζεται άμεσα με χρωμοσωμικές ανωμαλίες ή μεταλλάξεις του EGFR γονιδίου<sup>8,12</sup>. Υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα ως προς την ανοσοϊστοχημική έκφραση του EGFR στους πρωτοπαθείς όγκους και στις μεταστάσεις<sup>10,11</sup>. Επιπροσθέτως αντικρουόμενα είναι τα ευρήματα όσον αφορά τη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της EGFR γλυκοπρωτεΐνης και της ενίσχυσης του γονιδίου EGFR που ανιχνεύεται με μοριακές τεχνικές και ειδικότερα με FISH<sup>8,12,13</sup>.

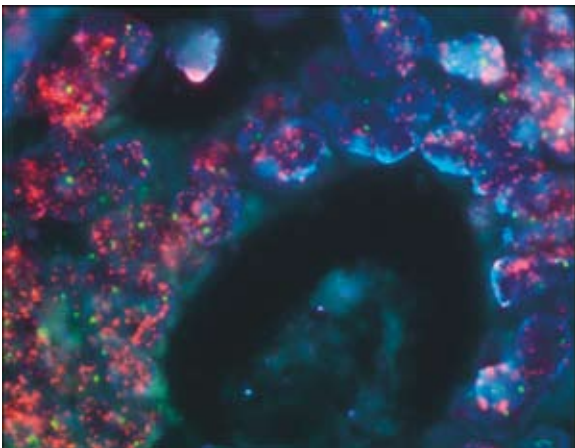
Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του EGFR με την ενδεχόμενη παρουσία αριθμητικών διαταραχών του αντίστοιχου γονιδίου (ενίσχυση, επαύξηση, απώλεια) ή/και τυχόν χρωμοσωμικές αριθμητικές ανωμαλίες (ανεπλοειδία χρωμοσώματος 7), καθώς επίσης και μεταξύ των ανοσοϊστοχημικών και μοριακών ευρημάτων μας με κλινικές και ιστολογικές παραμέτρους.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το υλικό μας αφορούσε 61 περιπτώσεις ασθενών με καρκίνωμα παχέος εντέρου. Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση, ενώ κανένας δεν έλαβε προεγχειρητική χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Το υλικό, κύβοι παραφίνης από αντιπροσωπευτικές θέσεις του κάθε νεοπλάσματος, προέρχονταν από το αρχείο του Εργαστηρίου Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ. και από την Ελληνική Συνεργαζόμενη Ογκολογική Ομάδα. Η ιστολογική ταξινόμηση των καρκινωμάτων έγινε σύμφωνα με τα κριτήρια της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ-WHO) σε καλής, μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης<sup>14</sup>. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και το σύστημα ταξινόμησης των 2 βαθμών κακοήθειας: τα καρκινώματα καλής και μέτριας διαφοροποίησης κατατάσσονται στην ομάδα αδενοκαρκινωμάτων χαμηλού βαθμού κακοήθειας ενώ τα χαμηλής διαφοροποίησης (εδώ συμπεριλαμβάνονται και τα βλεννώδη) ταξινομούνται ως υψηλού βαθμού κακοήθειας<sup>14</sup>. Η παθολογοανατομική σταδι-



**Εικόνα 1α.** Αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου αρνητικό στον EGFR. Αριστερά διακρίνονται κύτταρα της βλεννογονίου μνίκης στιβάδας θετικά για τον εν λόγω υποδοχέα AIX x400.



**Εικόνα 1β.** Αντιπροσωπευτική περιοχή της περίπτωσης στην Εικ. 1α με φθορίζοντα *in situ* υβριδισμό. Όλα τα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζουν υψηλού βαθμού ενίσχυση του γονιδίου EGFR (πολλαπλά ερυθρά σήματα). Τα πράσινα σήματα αντιστοιχούν στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 7 (CEP7), x1000.

οποίηση έγινε σύμφωνα με το σύστημα κατά Astler-Coller<sup>15</sup> και η κλινική σταδιοποίηση της νόσου σύμφωνα με το σύστημα TNM<sup>14</sup>. Τα κλινικά και παθολογοανατομικά στοιχεία αναφέρονται στον Πίνακα 1.

#### Ανοσοϊστοχημεία (AIX)

Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος εφαρμόστηκε σε πρόσφατες τομές παραφίνης από κάθε

όγκο, πάχους 2,5 μm. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της σημασμένης στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (LSAB). Ειδικότερα οι τομές επώασθηκαν στους 60°C για 16-18 ώρες, αποπαραφινώθηκαν και αφυδατώθηκαν. Η εξουδετέρωση της ενδογενούς υπεροξειδάσης έγινε με τη χρησιμοποίηση διαλύματος μεθανόλης και 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 20 λεπτά. Ακολούθησε επώαση των τομών για 8 λεπτά στους 37°C με πρωτεΐνάση K (DakoCytomation, DK) και στη συνέχεια επώαση για 10 λεπτά σε Powerblock (BioGenex, USA) για να αποφευχθεί η μη-ειδική χρώση του υποστρώματος. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του εξωκυττάριου τμήματος του EGFR (1:50 αραιώση, κλώνος 31G7, ZYMED, USA) επώασθηκε για 18 ώρες σε θερμοκρασία 4°C. Στη συνέχεια, έγινε επώαση 30 λεπτών με το συνδεδεμένο με βιοτίνη δευτερογενές αντίσωμα (biotinylated secondary antibody, mouse/rabbit, DakoCytomation) και επώαση με σημασμένη με ένζυμο στεπταβιδίνη (label, BioGenex) για 30 λεπτά. Ακολούθησε η εφαρμογή της διαμινοβενζιδίνης (DAB, BioGenex) ως χρωμογόνου για 8 λεπτά, καλό ξέπλυμα των τομών σε τρεχούμενο νερό και αντίχρωση των τομών με αιματοξυλίνη Mayer's (BioGenex) για 20 δεύτερα. Σε όλες τις φάσεις της ανοσοϊστοχημικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε TBS (DakoCytomation) ως ρυθμιστικό διάλυμα για το ξέπλυμα των ιστολογικών τομών.

Τα αποτελέσματα των ανοσοχρώσεων αξιολογήθηκαν ανά ζεύγη από 3 παρατηρητές (MM-EB, MM-IK). Η αξιολόγηση έγινε «τυφλά» χωρίς τη γνώση των κλινικών ή ιστολογικών δεδομένων. Σε περιπτώσεις ασυμφωνίας μεταξύ των παρατηρητών ακολούθησε επανεξέταση των περιπτώσεων και από τους 3 παρατηρητές ώστε να επιτευχθεί συναίνεση. Η θετικότητα της ανοχρώσης αξιολογήθηκε σε ολόκληρη την τομή σύμφωνα με τα εγκεκριμένα από το FDA (Food and Drug Administration) κριτήρια για το EGFR pharmDx™ (DakoCytomation). Ειδικότερα, οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική χρώση των κυτταρικών μεμβρανών του όγκου (πλήρης ή ατελής περιφερειακή), που υπερβαίνει τη χρωστική ένταση του υποστρώματος σε ποσοστό θετικών κυττάρων >1%, αξιολογήθηκε ως θετική. Επιπρόσθετα, η ένταση της χρώσης αξιολογήθηκε σύμφωνα με το προτεινόμενο τετραβάθμιο σύστημα ως εξής: 0: απουσία χρωστικής αντίδρασης, κυτταροπλασματική ή κοκκώδης χρώση, 1+: ήπια χρωστική αντίδρα-

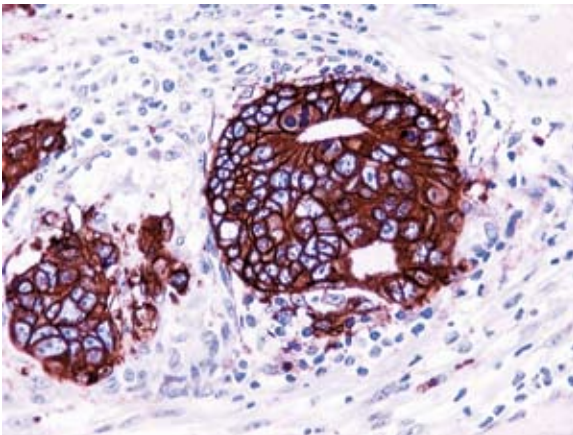
ση (αμυδρή μεμβρανική χρώση), 2+: μέτρια χρωστική αντίδραση (μέτριας έντασης πλήρης ή ατελής μεμβρανική χρώση), 3+: έντονη χρωστική αντίδραση (έντονος χρωματισμός του κυτταρικού περιγράμματος, ολικός ή τμηματικός)<sup>16,17</sup>. Οι περιπτώσεις με χρωστική αντίδρα-

ση 2+ και 3+ θεωρήθηκαν ότι υπερέκφραζαν τον EGFR<sup>18</sup>. Ως θετικός εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το περινεύριο και οι λείες μυϊκές ίνες των μυϊκών χιτώνων, όπου υπήρχαν, ενώ ως εξωτερικός θετικός μάρτυρας γνωστό για τη θετικότητα του αδενοκαρκίνωμα παχέος

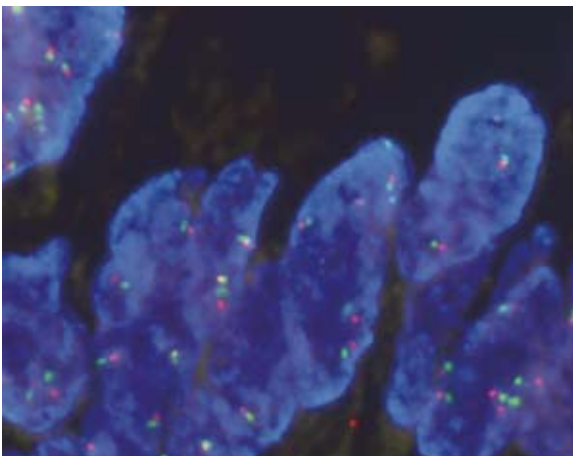
**Πίνακας 1.** Συσχέτιση της έκφρασης του EGFR με AIX και FISH και των χρωμοσωμικών ανωμαλιών με τις κλινικο-παθολογοανατομικές παραμέτρους

	Ανοσοϊστοχημεία (AIX)				FISH							
	EGFR				CEP7							
	Έκφραση +/-**	P	Υπερέκφραση +/-	P	Ενίσχυση +/-	P	Επαύξηση +/-	P	Απώλεια +/-	P	Επαύξηση +/-	P
Φύλο		0,11		NS		NS		NS		NS		NS
Άνδρες	22/13		5/30		2/33		13/22		2/33		6/29	
Γυναίκες	11/15		6/20		1/25		11/15		3/23		7/19	
Μέγεθος του όγκου (εκ)		NS		NS		NS		NS				NS
<3	3/5		2/6		1/7		3/5		1/7	NS	1/7	
3-6	24/15		7/32		1/38		16/23		4/35		10/29	
>6	6/8		2/12		1/13		5/9		0/12		2/12	
Εντόπιση του όγκου*		NS		NS		NS		NS		NS		NS
Δεξιό κόλο	9/5		2/12		2/12		5/9		2/12		4/10	
Αριστερό κόλο	19/15		7/27		1/33		12/22		2/32		6/28	
Ορθό	3/5		1/7		0/8		4/4		1/7		1/7	
Διαφοροποίηση του όγκου		0,16		NS		NS		NS		NS		NS
Καλή	2/1		1/2		0/3		1/2		0/3		0/3	
Μέτρια	27/23		10/40		3/47		21/29		4/46		12/38	
Χαμηλή	3/0		0/5		0/3		1/2		1/2		0/3	
Βλεννώδες	1/4		0/3		0/5		1/4		0/5		1/4	
Βαθμός κακοήθειας		NS		NS		NS		NS		NS		NS
Χαμηλή	29/24		10/43		3/50		22/31		4/49		1/41	
Υψηλή	4/4		1/7		0/8		2/6		1/7		1/7	
Σταδιοποίηση		NS		NS		NS		0,15		NS		NS
B1	2/1		0/3		0/3		0/3		0/3		0/3	
B2	9/7		3/13		0/16		7/9		2/14		5/11	
C1	6/2		3/5		0/8		1/7		0/8		1/7	
C2	16/18		5/29		3/31		16/18		3/31		7/27	
Στάδιο νόσου (TNM)		NS		NS		NS		NS		NS		NS
I	2/0		0/2		0/2		0/2		0/2		0/2	
II	7/5		2/10		0/12		5/7		2/10		3/9	
III	21/21		8/34		3/39		17/25		3/39		9/33	
IV	3/2		1/4		0/5		2/3		0/5		1/4	

Τιμή του P<0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική. \* 56 περιπτώσεις, \*\* θετικές περιπτώσεις/αρνητικές περιπτώσεις



**Εικόνα 2α.** Έντονη θετικότητα (+3) των νεοπλασματικών κυττάρων με ατελή και σε αρκετά κύτταρα πλήρη μεμβρανική χρωστική αντίδραση για τον EGFR υποδοχέα, AIX x400.



**Εικόνα 2β.** Φθορίζων in situ υβριδισμός της ίδιας περίπτωσης στην οποία παρατηρήθηκε πολυσωμία. Παρατηρείται σε αρκετά νεοπλασματικά κύτταρα αύξηση τόσο του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου EGFR (ερυθρά σήματα) όσο και του CEP7 (πράσινα σήματα), x1000.

εντέρου. Αρνητικό μάρτυρα αποτέλεσαν οι λεμφοκυτταρικές αθροίσεις.

#### **Φθορίζων In Situ Υβριδισμός (FISH)**

Η μέθοδος FISH εφαρμόστηκε σε τομές παραφίνης πάχους 3,5μm χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο σύμπλεγμα ιχνηθετών LSI™ EGFR Spectrum Orange/CEP7 Spectrum Green Probe (Vysis, USA). Ο EGFR

Spectrum Orange (ερυθρό σήμα) ιχνηθέτης έχει μέγεθος 300 kb και σημαίνει ολόκληρο το γονίδιο του EGFR που βρίσκεται στο τμήμα 7p12, ενώ ο CEP7 ιχνηθέτης που είναι σημασμένος με Spectrum Green (πράσινο σήμα), χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του α-δορυφορικού DNA που αντιστοιχεί στην περιοχή του κεντρομεριδίου του χρωμοσώματος 7 (7p11,1-q11,1). Η τεχνική έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας με μικρές αλλαγές. Ειδικότερα, η αποπαραφίνωση των τομών έγινε με ολονύκτια επώαση στους 60°C την οποία ακολούθησε εμφύσηση σε ξυλόλη (2x5 λεπτά) και αφυδάτωση σε 100% αλκοόλη (2x5 λεπτά). Οι τομές στη συνέχεια αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προκατεργασία του ιστού με NaSCN (80°C για 30 λεπτά) και πέψη με πρωτεάση (37°C για 10 λεπτά). Η αποδιάταξη του DNA έγινε με εμφύσηση των τομών σε φορμαμίδη 70%, pH 7,5, στους 72°C για 5 λεπτά. Ακολούθησε ο υβριδισμός ο οποίος έγινε με ολονύκτια επώαση των τομών με 10μL του ιχνηθέτη στους 37°C. Την επόμενη ημέρα ακολούθησε μεθυβριδική ξέπλυση με διάλυμα SSC και 0,3% NP-40 σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εμφύσηση των τομών στο ίδιο διάλυμα στους 72°C για 7 λεπτά. Επακολούθησε στέγνωμα των τομών, αντίχρωση με DAPI, στέγνωμα στον αέρα και κάλυψη. Η αξιολόγηση του υβριδισμού έγινε σε μικροσκόπιο Zeiss (Axioskop 2 plus HBO 100) το οποίο φέρει υψηλής ποιότητας αντικειμενικούς φακούς, επιλεγμένα φίλτρα (EX BP360/51 για την DAPI, EX BP485/17 για το FITC/spectrum green και EX BP560/18 για τη rhodamine/spectrum orange) καθώς και ψηφιακή κάμερα. Η ανάλυση των ψηφιακών εικόνων έγινε με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος (FISH Imager™ METASYSTEMS).

#### **Αξιολόγηση των αριθμητικών γονιδιακών διαταραχών**

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του FISH έγινε ταυτόχρονα από 2 παρατηρητές (MM, ΙΚ). Τα φθορίζοντα υβριδικά σήματα μετρήθηκαν σε 100 μη επικαλυπτόμενους νεοπλασματικούς πυρήνες. Υπολογίστηκε ο μέσος όρος σημάτων για το EGFR γονίδιο, το κεντρομερίδιο 7 (CEP7) καθώς και ο λόγος EGFR/CEP7. Περιπτώσεις στις οποίες ανευρεθήκαν σωροί ερυθρών σημάτων (cluster type signals) που αντιστοιχούν σε πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου EGFR και με λόγο

EGFR/CEP7 >2 θεωρήθηκαν ότι έχουν υψηλή ενίσχυση, ενώ περιπτώσεις με διάσπαρτα ερυθρά σήματα (scattered type signals) και με λόγο EGFR/CEP7 >1,3-2 χαμηλή ενίσχυση<sup>12,19</sup>. Ως επαύξηση του γονιδίου EGFR θεωρήθηκε η καταγραφή >2 ερυθρών σημάτων σε >20% των καταμετρημένων κυττάρων, ενώ ως ολική ή μερική απώλεια ορίσθηκε όταν κατά αντιστοιχία σε ποσοστό >30% και 20-30% των κυττάρων εμφάνιζε απώλεια των ερυθρών σημάτων<sup>20</sup>. Οι ανωτέρω οριακές τιμές χρησιμοποιήθηκαν και για τον καθορισμό της αριθμητικής επαύξησης και της ολικής ή μερικής απώλειας του χρωμοσώματος 7. Άλλες αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που καταμετρήθηκαν είναι η τρισωμία (3 πράσινα σήματα σε  $\geq 20\%$  των κυττάρων), η πολυσωμία (>4 πράσινα σήματα σε  $\geq 20\%$  των κυττάρων) και η πολυπλοειδία (>2 πράσινα σήματα σε  $\geq 20\%$  των κυττάρων)<sup>21</sup>.

### Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 11,5 (SPSS Inc, USA) για το λειτουργικό σύστημα Windows XP (Microsoft, USA). Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης μη παραμετρικών μεταβλητών Pearson's chi-square ( $\chi^2$ ) για τη συσχέτιση μεταξύ της AIX έκφρασης του EGFR και της ενίσχυσης, της επαύξησης ή της απώλειας του γονιδίου EGFR και των χρωμοσωμικών αριθμητικών ανωμαλιών του χρωμοσώματος 7 (τρисωμία, πολυσωμία, πολυπλοειδία, απώλεια). Επιπλέον, έγινε συσχέτιση των AIX και όλων των μοριακών ευρημάτων με τις κλινικές και λοιπές παραμέτρους. Τιμή του  $\chi^2 < 0,05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 31 έως 75 ετών με μέσο όρο εμφάνισης της νόσου τα 58,5 ( $\pm 10,2$ ) έτη. Ανοσοϊστοχημική έκφραση του EGFR παρατηρήθηκε σε 33/61 (54%) περιπτώσεις, ενώ υπερέκφραση (2+, 3+) σε 11 από αυτές. Ο αριθμός σημάτων του γονιδίου EGFR ανά περίπτωση κυμάνθηκε από 1,12 έως 14,20 με μέση τιμή 2,02, ενώ σε 10 περιπτώσεις η τιμή ήταν >2,20. Αντίστοιχα για το CEP7 ο αριθμός σημάτων κυμάνθηκε από 1,17-3,07 με μέση τιμή 1,90 και σε 6 περιπτώσεις >2,20. Ο λόγος EGFR/CEP7 κυμάνθηκε από 0,86-8,11 με μέσο όρο 1,17. Υψηλού βαθμού ενίσχυση του γονιδίου EGFR ανευρέθηκε σε μία περι-

πτωση (αρνητική ανοσοχρώση, EGFR-), ενώ χαμηλού βαθμού ενίσχυση σε 2 (EGFR 1+, EGFR-) περιπτώσεις. Επαύξηση του γονιδίου EGFR εμφάνισαν 24 (39%) περιπτώσεις, ενώ απώλεια δεν καταμετρήθηκε σε καμία περίπτωση. Αντίστοιχα, επαύξηση του CEP7 παρουσίασαν 13, μερική απώλεια 4 και ολική απώλεια 1 περιπτώσεις. Πολυπλοειδία εμφάνισαν 10 και πολυσωμία 4 περιπτώσεις. Επαύξηση του EGFR/απώλεια του CEP7 παρατηρήθηκε σε 3 περιπτώσεις, ενώ ο συνδυασμός επαύξησης και των δύο σημάτων (ερυθρών και πρασίνων) σε 10 περιπτώσεις. Συνολικά αριθμητικές ανωμαλίες της γονιδιακής κατάστασης (gene profile) εμφάνισαν 27/61 (44%) περιπτώσεις.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του EGFR όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 ήταν ανεξάρτητη της γονιδιακής ενίσχυσης ή επαύξησης. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του EGFR και της πολυπλοειδίας ( $p=0,048$ ).

Στατιστικά σημαντική συσχέτιση ως προς την έκφραση/υπερέκφραση του EGFR σε σχέση με την εντόπιση, τον βαθμό κακοήθειας, τη διαφοροποίηση και τη σταδιοποίηση του νεο-

**Πίνακας 2.** Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων AIX και FISH

	P	
	Έκφραση EGFR	Υπερέκφραση EGFR
Ενίσχυση EGFR γονιδίου	0,46	0,4
Επαύξηση EGFR γονιδίου	0,99	0,64
Απώλεια EGFR γονιδίου	ΔΠ	ΔΠ
Επαύξηση CEP7	0,52	0,78
Απώλεια CEP7	0,51	0,27
Ενίσχυση EGFR/ Ενίσχυση CEP7	0,33	0,89
Ενίσχυση EGFR/ Απώλεια CEP7	0,46	0,4
Τρισωμία Χρ. 7	0,18	0,23
Πολυσωμία Χρ. 7	0,86	0,71
Πολυπλοειδία Χρ. 7	0,68	0,048

Η τιμή του P <0,05 θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική και τονίζεται με την έντονη γραφή. AIX: Ανοσοϊστοχημεία, ΔΕ: Δεν πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση λόγω μη ανεύρεσης περιπτώσεων με απώλεια του γονιδίου EGFR.

πλάσματος δεν παρατηρήθηκε. Ενίσχυση του γονιδίου EGFR βρέθηκε μόνο σε νεοπλάσματα χαμηλής κακοήθειας (μέτριας διαφοροποίησης), υψηλού ιστολογικού σταδίου (C2) και προχωρημένου κλινικού σταδίου (III), ενώ επαύξηση του γονιδίου EGFR διαπιστώθηκε και σε καρκινώματα υψηλής κακοήθειας, με ή χωρίς λεμφαδενικές μεταστάσεις, αρχόμενου ή και προχωρημένου κλινικού σταδίου (II-IV). Αξιοπρόσεκτο είναι ότι κανένα καρκίνωμα του ορθού δεν παρουσίασε κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία του τύπου της πολυπλοειδίας (τρισωμία, πολυσωμία). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων της μελέτης μας παρουσιάζεται στον Πίνακα 1, ενώ στον Πίνακα 2 καταγράφονται οι συσχετίσεις μεταξύ της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του EGFR και των ευρημάτων FISH.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου τα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζουν σημαντικό βαθμό χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Αυτές είναι αριθμητικές και αφορούν είτε ενισχύσεις (5p, 6p, 7, 8q, 13q, 17q, 19q, 20q και Xq) είτε απώλειες ολόκληρων χρωμοσωμάτων, τμημάτων ή σκελών χρωμοσωμάτων (1p, 4q, 8p, 14q, 18q, χρ. 11)<sup>22-25</sup>. Στα καρκινώματα του παχέος εντέρου, όπως φαίνεται από διάφορες μελέτες, κάποιες χρωμοσωμικές διαταραχές σχετίζονται με βραχεία επιβίωση (απώλεια 1p, 4q, 8p, 14q, 18q, χρ. 11, επαύξηση 20q)<sup>24,25</sup>, ενώ άλλες με την εξέλιξη της νόσου (ανευπλοειδία χρ. 18)<sup>26</sup>.

Για την έρευνα των χρωμοσωμικών ανωμαλιών ο συγκριτικός υβριδισμός γονιδιώματος (comparative genomic hybridization, CGH) αποτελεί μια σημαντικά χρήσιμη μέθοδο, ενώ είναι ευρέως αποδεκτό ότι η εφαρμογή του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH) με τη χρησιμοποίηση ειδικών δορυφορικών κεντρομεριδιακών δεικτών DNA αποτελεί μία αξιόπιστη μέθοδο για τον προσδιορισμό της πλοειδίας. Επιπρόσθετα η μέθοδος FISH χρησιμοποιείται και στην ανίχνευση της ενίσχυσης ή της απώλειας συγκεκριμένων γονιδίων (HER-2, PTEN, TOPOISOMERASE II, C-MYC, p16, p53 κ.α.) καθώς και χρωμοσωμικών μεταθέσεων, ενώ υπερέχει της ποσοτικής PCR μεθόδου στην ανίχνευση της χαμηλής επαύξησης/ενίσχυσης του γονιδίου EGFR (λόγος EGFR/CEP7 <3)<sup>12,13</sup>.

Ενώ για την αξιολόγηση με FISH του HER-2 εφαρμόζεται ένα γενικώς αποδεκτό σύστημα καταμέτρησης/εκτίμησης, στην περίπτωση του EGFR δεν υπάρχει έως τώρα ένα ενιαίο ευρέως αποδεκτό σύστημα εκτίμησης με αποτέλεσμα να παρατηρούνται ποικίλα αποτελέσματα. Όπως παρουσιάζεται στη βιβλιογραφία το ποσοστό ενίσχυσης του γονιδίου EGFR με FISH είναι σχετικά χαμηλό και κυρίως του τύπου της χαμηλής ενίσχυσης (λόγος EGFR/CEP7 από 1,3-2), ενώ η υψηλού τύπου ενίσχυση (λόγος EGFR/CEP7 >2) είναι σπάνια. Στα γλοιώματα το ποσοστό ενίσχυσης του EGFR κυμαίνεται από 15% έως 45%<sup>27,28</sup>, στο καρκίνωμα του στομάχου 7,4%<sup>29</sup>, στο καρκίνωμα του μαστού από 6,3%-19,4%<sup>30,31</sup>, στα θυμώματα 22%<sup>32</sup> και στο πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου 14%<sup>33</sup>. Στον ορθοκολικό καρκίνο η ενίσχυση του EGFR κυμαίνεται από 0-58%<sup>8,12,13</sup>.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήσαμε ενίσχυση του γονιδίου EGFR στο 5% και 2% των περιπτώσεων με βάση την οριακή τιμή του λόγου EGFR/CEP7 (>1,3 και >2) αντιστοίχως που χρησιμοποιήθηκε. Η ενίσχυση αυτή παρατηρήθηκε σε 2 αρνητικές ανοσοϊστοχημικά για τον EGFR περιπτώσεις, ενώ η τρίτη εμφάνισε ήπια ατελή μεμβρανική χρωστική αντίδραση (1+). Στην περίπτωση με την υψηλού τύπου ενίσχυση (EGFR-) τα υβριδικά σήματα σχημάτιζαν κυρίως σωρούς (cluster type signals) ενώ στις υπόλοιπες 2 τα σήματα ήταν διασκορπισμένα (scattered type signals). Σε αντίστοιχη μελέτη οι Ooi και συν.<sup>12</sup> περιέγραψαν ενίσχυση του EGFR στο 58% των περιπτώσεων ορθοκολικού καρκίνου με μέτρια (2+) ή έντονη (3+) ανοσοχρώση, ενώ καμία περίπτωση με χρώση 1+ καθώς και τα περιστατικά μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν ενίσχυση του γονιδίου EGFR. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων εμφάνιζε ενίσχυση του τύπου των διάσπαρτων σημάτων, ενώ 2/11 ήταν κυρίως του τύπου των σωρών. Ενίσχυση του γονιδίου EGFR σε 7/29 (21%) αναφέρεται και από τους Moroni και συν.<sup>13</sup>. Σε αντιδιαστολή με τα ευρήματα των παραπάνω, οι Sauer και συν.<sup>8</sup> δεν παρατήρησαν ενίσχυση του γονιδίου EGFR (όταν ο λόγος EGFR/CEP7 >2) σε καμία από τις εξεταζόμενες περιπτώσεις (48 καρκινώματα ορθού).

Η γονιδιακή ενίσχυση του EGFR δεν σχετίζεται απαραίτητα με την AIX έκφραση της πρωτεΐνης<sup>8</sup>. Στην παρούσα μελέτη όσο και στη μελέτη των Sauer και συν. η έκφραση/υπερέκφραση του EGFR σε AIX επίπεδο ήταν ανεξάρ-

τητη της ενίσχυσης του γονιδίου EGFR, ενώ στη μελέτη των Οοί και συν.<sup>12</sup> η υπερέκφραση εμφάνισε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τη γονιδιακή ενίσχυση του EGFR.

Σε πρόσφατη μελέτη με FISH του μεταστατικού ορθοκολικού καρκίνου οι Moroni και συν. παρατήρησαν ότι οι ασθενείς (8/9) που απάντησαν στη στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς του EGFR (cetuximab, panitumumab) είχαν υψηλό λόγο αντιγράφων γονιδίου EGFR/πυρήνα κυττάρου (μέση τιμή 6,90), ενώ η μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών (19/20) χωρίς ανταπόκριση στη θεραπεία είχε χαμηλό λόγο αντιγράφων γονιδίου EGFR/πυρήνα κυττάρου (μέση τιμή 1,93). Αν και ο αριθμός των ασθενών της παραπάνω μελέτης είναι μικρός (29/31) φαίνεται ότι η ανίχνευση της επαύξησης/ενίσχυσης του γονιδίου EGFR με FISH μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος επιλογής ασθενών που πιθανόν να επωφεληθούν από τη θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα. Η παραπάνω μελέτη εξηγεί εν μέρει τα αποτελέσματα των Chung και συν.<sup>9</sup> οι οποίοι παρατήρησαν απάντηση στη θεραπεία με cetuximab ασθενών με αρνητική AIX έκφραση του EGFR.

Από την εργασία μας προκύπτει υψηλό ποσοστό επαύξησης 24/61 (39%) του γονιδίου EGFR με σχεδόν παρόμοια κατανομή στα EGFR+ και EGFR- καρκινώματα (Πίν. 2) και συνδυασμός επαύξησης του γονιδίου EGFR και του χρωμοσώματος 7 σε 10 περιπτώσεις. Επαύξηση του γονιδίου EGFR με FISH αναφέρεται στο 15% των περιπτώσεων από τους Sauer και συν. χρησιμοποιώντας ως σύστημα αξιολόγησης τον λόγο αντιγράφων γονιδίου EGFR/αριθμός χρωμοσωμάτων 7 με οριακή τιμή 1,2. Επαύξηση του 7p παρατηρήθηκε από τους De Angelis και συν. με την τεχνική CGH.

Συμπερασματικά, φαίνεται από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, ότι η γονιδιακή ενίσχυση και επαύξηση του EGFR δεν σχετίζεται απαραίτητα με την ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, η ενίσχυση του γονιδίου EGFR που παρατηρήσαμε σε ανοσοϊστοχημικά αρνητικές περιπτώσεις δείχνει ότι η μέθοδος FISH είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για την ανάδειξη περιπτώσεων που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από τη στοχευμένη θεραπεία. Από την άλλη πλευρά λόγω της ύπαρξης στη διεθνή βιβλιογραφία ολιγάριθμων εργασιών (3 συνολικά εργασίες που υπέπεσαν στην αντίληψη μας και τα αποτελέσματα

τους αναφέρονται) με διαφορετικό σύστημα αξιολόγησης της ενίσχυσης/επαύξησης του γονιδίου EGFR καθώς και της ανοσοϊστοχημικής χρώσης δεν είναι απολύτως εφικτή μία σύγκριση των μεταξύ τους αποτελεσμάτων και η αντιπαράθεση με τα δικά μας αποτελέσματα. Ως εκ τούτου για τον προσδιορισμό της ενίσχυσης/επαύξησης του γονιδίου EGFR με σκοπό την αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με ορθοκολικό καρκίνο απαιτείται περαιτέρω λεπτομερής διερεύνηση σε μοριακό επίπεδο και κλινική συσχέτιση.

*Η παρούσα εργασία τιμήθηκε με το βραβείο «Γ. Τηνιακός» για την καλύτερη εργασία με θέμα την Παθολογική Ανατομική του Πεπτικού Συστήματος στα πλαίσια του 10<sup>ου</sup> Πανελληνίου Συνεδρίου Παθολογικής Ανατομικής, Ιωάννινα, Μάιος 2006.*

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Meyerhardt JA, Robert J, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 352:476-487, 2005.
2. Chau I, Cunningham D. Chemotherapy in colorectal cancer: new options and new challenges. *Br Med Bull* 64: 159-180, 2002.
3. Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* 7:Suppl 4:2-8, 2002.
4. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37:S9-S15, 2001.
5. Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Park JM, Salonga D, et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin Cancer Res* 7:1850-1855, 2001.
6. De Jong KP, Stellema R, Karrenbeld A. Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, p53 and Ki-67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors. *Hepatology* 28:971-979, 1998.
7. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:337-45, 2004.
8. Sauer T, Guren MG, Noren T, Dueland S. Demonstration of EGFR gene copy loss in colorectal carcinomas by fluorescence in situ hybridization (FISH): a surrogate marker for sensitivity to specific anti-EGFR therapy? *Histopathology* 47:560-564, 2005.
9. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al. Cetuximab shows activity in

- colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 23:1803-1810, 2005.
10. Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Fabris G, Cascinu S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: Implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 22:4772-4778, 2004.
  11. Italiano A, Saint-Paul MC, Caroli-Bosc FX, Francois E, Bourgeon A, Benchimol D, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors correlates with EGFR expression in related metastatic sites: biological and clinical implications. *Ann Oncol* 16:1503-1507, 2005.
  12. Ooi A, Takehana T, Li X, Suzuki S, Kunitomo K, Iino H, et al. Protein overexpression and gene amplification of HER-2 and EGFR in colorectal cancers: an immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization study. *Mod Pathol* 17:895-904, 2004.
  13. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 6:279-286, 2005.
  14. Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds.): World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. IARC Press: Lyon 2000.
  15. Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 139:846-851, 1954.
  16. Vilorio-Petit A, Crombet T, Jothy S, et al. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: A role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res* 61:5090-5101, 2001.
  17. Scartozzi M, Bearzi I, Berardi R, Mandolesi A, Fabris G, Cascinu S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status in primary colorectal tumors does not correlate with EGFR expression in related metastatic sites: Implications for treatment with EGFR-targeted monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 22:4772-4778, 2004.
  18. Takehana T, Kunitomo K, Suzuki S, Kono K, Fujii H, Matsumoto Y, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in gastric carcinomas. *Clin Gastroenterol Hepatol* 1:438-445, 2003.
  19. Sunpaweravong P, Sunpaweravong S, Puttawibul P, Mitarnun W, Zeng C, Baron A, et al. Epidermal growth factor receptor and cyclin D1 are independently amplified and overexpressed in esophageal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 131:111-119, 2005.
  20. Reardon DA, Quinn JA, Vredenburg JJ, Gururangan S, Friedman AH, Desjardins A, et al. Phase 1 trial of gefitinib plus serolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 12:860-868, 2006.
  21. Specht K, Haralambieva E, Bink K, Kremer M, Mandl-Weber S, Koch I, et al. Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels. *Blood* 104:1120-1126, 2004.
  22. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532, 1988.
  23. Muleris M, Salmon RJ, Dutrillaux B. Cytogenetics of colorectal adenocarcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 46:143-156, 1990.
  24. Bardi G, Sukhikh T, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S. Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 12:97-109, 1995.
  25. De Angelis PM, Stokke T, Beigi M, Mjeland O, Clausen OPF. Prognostic significance of recurrent chromosomal aberrations detected by comparative genomic hybridization in sporadic colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 16:38-45, 2001.
  26. Nanashima A, Tagawa Y, Yasutake T, Fujise N, Kashima K, Nakagoe T, et al. Deletion of chromosome 18 and development of colorectal carcinoma. *Cancer Detect Prev* 21:7-11, 1997.
  27. Marquez A, Wu R, Zhao J, Tao J, Shi Z. Evaluation of epidermal growth factor receptor (EGFR) by chromogenic in situ hybridization (CISH) and immunohistochemistry (IHC) in archival gliomas using bright-field microscopy. *Diagn Mol Pathol* 13:1-8, 2004.
  28. Korshunov A, Sycheva R, Golanov A. Molecular stratification of diagnostically challenging high-grade gliomas composed of small cells: The utility of fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 10:7820-7826, 2004.
  29. Kimura M, Tsuda H, Morita D, Ichikura T, Ogata S, Aida S, et al. A proposal for diagnostically meaningful criteria to classify increased epidermal growth factor receptor and *cerbB-2* gene copy numbers in gastric carcinoma, based on correlation of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical measurements. *Virch Arch* 445:255-262, 2004.
  30. Kersting C, Tidow N, Schmidt H, Liedtke C, Neumann J, Boecker W, et al. Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of *egfr* amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. *Lab Invest* 84:582-587, 2004.
  31. Speer G, Cseh K, Winkler G, Takacs I, Nagy Z,

- Lakatos P. Oestrogen and vitamin D receptor (VDR) genotypes and the expression of ErbB-2 and EGF receptor in human rectal cancers. *Eur J Cancer* 37: 1463–1468, 2001.
32. Ionescu DN, Sasatomi E, Cieply K, Nola M, Dacic S. Protein expression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in thymomas. *Cancer* 103:630–636, 2005.
33. Hanawa M, Suzuki S, Dobashi Y, Yamane T, Kono K, Enomoto N, et al. EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. *Int J Cancer* 118:1173–1180, 2006.

---

**Corresponding author:**

Mattheos Bobos, MD  
Department of Pathology  
Aristotle University Medical School  
540 06 Thessaloniki, Greece  
Telephone number: 2310 999225  
Fax number: 2310 999229  
E-mail address: mbobos@auth.gr

---

**Υπεύθυνος αλληλογραφίας:**

Ματθαίος Μπόμπος,  
Εργαστήριο Γενικής Παθολογίας και Παθολογικής  
Ανατομικής  
Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ., 540 06 Θεσσαλονίκη  
Τηλ: 2310 999225  
Fax: 2310 999229  
E-mail:mbobos@auth.gr