

Διερεύνηση του ρόλου του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN στην ανθεκτικότητα του πορογενούς αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος σε στοχευμένη anti-HER2/neu θεραπεία: Συνδυασμένη μελέτη ανοσοϊστοχημείας και χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού σε ιστικές μικροσυστοιχίες

Τσιάμπας Ε.¹, Καραμέρης Α.¹, Τηνιακού Ντ.², Καρακίτσος Π.², Πατσούρης Ε.³, Κίττας Χ.²

Potential involvement of PTEN expression in resistance to anti-HER2 targeted therapies in pancreatic ductal adenocarcinoma: A combined chromogenic *in situ* hybridization and immunohistochemistry analysis based on tissue microarrays

Tsiambas E.¹, Karameris A.¹, Tiniakos D.², Karakitsos P.², Patsouris E.³, Kittas Ch.²

¹Department of Pathology, 417 VA (NIMTS) Hospital, Athens, Greece, ²Lab of Histology & Embryology, Medical School, National and Kapodestrian University of Athens, Greece, ³Department of Pathology, Medical School, National and Kapodestrian University of Athens, Greece

Background/Aim: HER2/neu overexpression is observed in different proportions of pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC). However, the specific mechanisms of gene deregulation and chemo resistance to novel targeted therapeutic agents remain under investigation. Our aim was to identify HER2/neu gene alterations in PDAC correlating them to its protein levels and also to PTEN suppressor gene expression, which normally opposes the activation of PI3K-Akt-m TOR signaling pathway. **Materials and Methods:** Using tissue microarray technology, fifty (n=50) paraffin embedded tissue samples of histologically confirmed primary PDACs were cored at a diameter of 1mm and re-embedded into one final recipient block. Ten (n=10) samples of normal epithelia, adjacent to cancerous tissue were used as normal control group. Immunohistochemistry was performed by the use of anti-

HER2/neu monoclonal antibody (TAB 250) and anti-PTEN polyclonal antibody. Chromogenic in situ hybridization was applied based on the use of HER2/neu gene and 17 centromeric probes, respectively. Protein expression levels were evaluated using an image analysis system. SPSS (chi square test and interrater kappa) was performed for statistical analysis. **Results:** HER2/neu protein over expression was observed in 10/50 (20%) and was correlated only to tumor grade ($p=0.019$). Low levels or loss of PTEN protein expression were observed in 17/50 (34%) cases and were significantly associated to tumor grade and stage ($p=0.044$ and $p=0.02$, respectively) Gene analysis identified 8/50 (16%) HER2/neu low-level gene amplified cases. Chromosome 17 analysis detected aneuploidy in 19/50 (38%) cases. Simultaneous HER2/neu overexpression and reduced PTEN expression was observed in 7 cases, whereas six of them demonstrated HER2/neu gene amplification (overall 95% CI kappa=0.12). In the control group, HER2/neu protein overexpression was identified in one case, whereas two cases demonstrated low-level PTEN protein expression. **Conclusions:** Our results indicate that a subset of PDAC is characterized by simultaneous HER2/neu over- and PTEN reduced expression including sporadic cases of HER2/neu gene amplification. The efficacy of targeted therapeutic strategies with monoclonal antibodies, such as trastuzumab, which, on binding to the HER2/neu receptor, stabilize and activate PTEN, may be reduced by the loss of PTEN expression in PDACs. In cases of HER2/neu gene amplification, which in breast cancer are associated to therapeutic response to these agents, the potential survival benefit for the PDAC patients is possibly lost.

Key words: pancreatic cancer, tissue microarrays, HER2/neu, PTEN, HER2/neu and PTEN in ductal pancreatic adenocarcinoma

Εισαγωγή - Σκοπός: Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on 10q23) αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του συστήματος μεταγωγής σημάτων προς τον πυρήνα PI3-K/Akt και η απορρύθμισή του στο αδενοκαρκίνωμα του μαστού –μέσω κυρίως σημειακής μετάλλαξης- συνδέεται με την ευαισθησία του όγκου σε στοχευμένη αντι- HER2/neu θεραπεία (μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab). Η διερεύνηση του ρόλου του στο πορογενές αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος, το οποίο αποτελεί ένα υψηλής κακοήθειας και εξαιρετικά πτωχής πρόγνωσης νεόπλασμα αποτέλεσε στόχο της μελέτης. **Υλικό - Μέθοδοι:** Κατασκευάστηκε με σύστημα ιστικών μικροσυστοιχιών ένας κύβος παραφίνης (διαμ ιστικών κυλίνδρων 1mm) με εμφυτευμένο το σύνολο των περιστατικών ($n=50$). Εν συνεχεία, διενεργήθηκε, σε συνεχείς μικροτομηθείσες τομές, ανοσοϊστοχημικός έλεγχος για την ανάδειξη της έκφρασης των δύο πρωτεϊνών (HER2/neu και PTEN), καθώς και Χρωμογόνο in Situ Υβριδισμός για τη διερεύνηση της αστάθειας του χρωμοσώματος 17 και του γονιδίου HER2/neu. Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας ποσοτικοποιήθηκαν με την εφαρμογή ημιαυτόματου συστήματος ανάλυσης εικόνας, ενώ η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό SPSS v 11.0 (chi square test, interrater kappa). **Αποτελέσματα:** Ανοσοϊστοχημική υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER2/neu (2+, 3+) παρατηρήθηκε σε 10/50 (20%), ενώ απώλεια ή υποέκφραση της PTEN σε 17/50 (34%) των εξετασθέντων όγκων. Ανευπλοειδία του χρωμοσώματος 17 παρατηρήθηκε σε 19/50 (38%), ενώ ενίσχυση του γονιδίου σε 8 (16%) όγκους. Ταυτόχρονη υπερέκφραση HER2/neu με απώλεια/ υποέκφραση PTEN παρατηρήθηκε σε 7 όγκους, 6 εκ των οποίων εμφάνιζαν ενίσχυση του γονιδίου HER2/neu (overall 95% CI kappa=0.12). Στατιστικά σημαντική

συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης του HER2/neu και του βαθμού διαφοροποίησης ($p=0.019$), ενώ η έκφραση του PTEN συσχετίστηκε οριακά με το βαθμό διαφοροποίησης ($p=0.044$), και σημαντικά με το στάδιο της νόσου ($p=0.02$). **Συμπεράσματα:** Ένα κλάσμα πασχόντων από πορογενές αδеноκαρκίνωμα του παγκρέατος πληροί τα μοριακά κριτήρια (ενίσχυση ογκογονιδίου HER2/neu και όχι ανοσοέκφραση του PTEN) για εφαρμογή στοχευμένης θεραπείας με μονοκλωνικά αντισώματα. Όμως η ταυτόχρονη απορρύθμιση του PTEN πιθανότατα ελαττώνει σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το αδеноκαρκίνωμα του μαστού την ευαισθησία στη συγκεκριμένη θεραπεία, διότι λόγω της αποσταθεροποίησής του δεν επάγεται η κατασταλτική δράση του μονοκλωνικού αντισώματος στο σύστημα μεταγωγής σημάτων προς τον πυρήνα PI3-K/Akt.

Λέξεις-κλειδιά: καρκίνος παγκρέατος, ιστικές μικροσυστοιχίες, HER2/neu, PTEN

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, ο οποίος λόγω της υπέρπουσας, σιωπηλής ανάπτυξης φέρει το θλιβερό προσωνύμιο “silent killer”, αποτελεί την 5^η αιτία θανάτου - συνδεδεμένη με κακήθες νόσημα- στις χώρες του δυτικού κόσμου, ενώ στις κακοήθειες τις προερχόμενες από το γαστρεντερικό σύστημα καταλαμβάνει τη δεύτερη θέση, αμέσως μετά από το αδеноκαρκίνωμα του παχέος εντέρου¹. Όσον αφορά στην επίπτωση του πορογενούς αδеноκαρκινώματος στο γενικό πληθυσμό, αυτό αποτελεί τη συχνότερη κακοήθεια του οργάνου, αντιπροσωπεύοντας το 80-90% του συνόλου των εξορμώμενων από την εξωκρινή μοίρα του οργάνου όγκων².

Οι διαταραχές του γενετικού υποστρώματος, κατά την εκδήλωση της καρκινογενετικής διαδικασίας του παγκρέατος, περιλαμβάνουν μια ευρεία ποικιλία συμβάντων όπως αριθμητικού ή δομικού τύπου χρωμοσωμικές ανωμαλίες (ανευπλοειδία, ελλείματα, διαμεταθέσεις) ή γονιδιακές τροποποιήσεις (σημειακές μεταλλάξεις, ενίσχυση, μικροδορυφορική αστάθεια, διαγραφή, απώλεια της ετεροζυγωτίας ή ομόζυγη εξάλειψη των δύο αλληλίων)³. Οι παθολογικές αυτές τροποποιήσεις του γενετικού υλικού φαίνεται ότι ακολουθούν μια χρονική ακολουθία δεδομένου ότι η μοριακή ανίχνευσή τους συμπίπτει με κάποιο από τα στάδια της προαναφερόμενης καρκινογενετικής διαδικασίας (Παγκρεατικές Ενδοεπιθηλιακές Νεοπλασίες – PanIns I-III) με οριακές αποκλίσεις κατά τη σύγκριση παρόμοιων μελετών^{4,5}. Η ανακάλυψη των εμπλεκόμενων γονιδίων

πραγματοποιήθηκε με τη μοριακή ανάλυση σποραδικών περιστατικών καρκίνου ή μελών οικογενειών με κληρονομική προδιάθεση για καρκίνο⁶.

Κομβικό ρόλο στη δημιουργία και κυρίως εξέλιξη του πορογενούς αδеноκαρκινώματος του παγκρέατος φαίνεται να διαδραματίζουν και τα συμπλέγματα των αυξητικών παραγόντων (Growth Factors) με τους αντίστοιχους υποδοχείς (Receptors)⁷. Η βιοχημική δομή των τελευταίων περιλαμβάνει το εξωκυττάριο τμήμα σύνδεσης πλούσιο σε κυστεΐνη (extracellular ligand – binding domain), μια υδρόφοβη διαμεμβρανική γέφυρα (hydrophobic transmembrane domain) και το ενδοκυττάριο τμήμα με τις τυροσινוקινασικές αλληλουχίες (intracellular cytoplasmic tyrosine kinase domain)⁸. Ειδικά η διερεύνηση των απορρυθμιστικών μηχανισμών του ογκογονιδίου HER2/neu αποτελεί πρόκληση, καθώς η υπερενεργοποίησή του σχετίζεται όχι μόνο με επιβαρυσμένη πρόγνωση (μικρό προσδόκιμο επιβίωσης, χημειοαντοχή, αυξημένο μεταστατικό δυναμικό) σε καρκίνους, όπως το αδеноκαρκίνωμα του μαστού, αλλά και με την εφαρμογή των νεότευκτων στρατηγικών στοχευμένων θεραπειών (novel targeted therapeutic strategies)⁹.

Το ογκογονίδιο HER2/neu εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 (γονιδιακή θέση 17q12-21) και αρχικά αναγνωρίστηκε ως ενεργοποιούμενο γονίδιο στο με χημικούς παράγοντες προκληθέν νευροβλάστωμα σε πειραματόζωα¹⁰. Η αντικατάσταση βαλίνης με γλουταμικό οξύ στη διαμεμβρανική περιοχή του μορίου της ογκοπρωτεΐνης NEU, όπως πρωταρχικά είχε

ονομασθεί, ενισχύει την ικανότητα για ογκογόνο μετασχηματισμό της (oncogenic transformation). Η παραγόμενη ογκοπρωτεΐνη, μοριακού βάρους 185 kDa, δρα ως διαμεμβρανικός υποδοχέας τύπου 1 και ανήκει λειτουργικά στην οικογένεια των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR/HER). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 4 μέλη γνωστά ως HER1/EGFR/c-erb-B1, HER2/neu/c-erb-B2, HER3/c-erb-B3 και HER4/c-erb-B4¹¹. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η συνεργική δράση του υποδοχέα HER2/neu/c-erb-B2 με τους υπόλοιπους, μέσω σχηματισμού ετεροδιμερών, ρυθμίζει το ρυθμό κυτταρικής ανάπτυξης, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων. Κάτω από ορισμένες συνθήκες γονιδιακής μετατροπής και αστάθειας μεταβιβάζει μιτογόνα σήματα μετά από διμερισμό του με τον HER3 και σύνδεση με τον παράγοντα neu ή heregulin. Η ενισχυμένη αυτή μεταγραφική δραστηριότητα οδηγεί τελικά στην ογκογένεση και αργότερα στη μεταστατική διαδικασία. Ειδικότερα στον καρκίνο του παγκρέατος, ενώ η υπερέκφραση του μορίου φαίνεται ότι κυμαίνεται σε μέτρια ποσοστά (15-20%), η ενίσχυση του γονιδίου (gene amplification) αλλά και η αστάθεια (ανευπλοειδία) του χρωμοσώματος 17 αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα για επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά του νεοπλάσματος¹²⁻¹⁴.

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου του HER2/neu στο πορογενές αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος με την εφαρμογή συστήματος ιστικών μικροσυστοιχιών (tissue microarrays), τόσο σε γονιδιακό και πρωτεϊνικό επίπεδο και ο συσχετισμός της δράσης του με εκείνη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on 10q23). Το τελευταίο αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του συστήματος μεταγωγής σημάτων προς τον πυρήνα PI3-K/Akt και η απορρυθμισή του στο αδενοκαρκίνωμα του μαστού –μέσω κυρίως σημειακής μετάλλαξης- συνδέεται με την ευαισθησία του όγκου σε στοχευμένη αντι-HER2/neu θεραπεία (μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab)^{15,16}.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικό

Το υλικό αφορούσε σε 50 σποραδικά πρωτοπαθή πορογενή αδενοκαρκινώματα παγκρέα-

τος μονιμοποιημένα σε ουδέτερη φορμόλη και εμβυθισμένο σε παραφίνη, προϊόντα μερικής ή εκτεταμένης παγκρεατεκτομής (κατά Whipple) και βαθμονομημένα - όσον αφορά τη διαφοροποίηση και τη σταδιοποίηση- σύμφωνα με τα ιστολογικά κριτήρια της WHO¹⁷. Ως ομάδα ελέγχου, χρησιμοποιήθηκαν 10 περιπτώσεις φυσιολογικού παγκρεατικού ιστού, κείμενα πλησίον των καρκινικών πληθυσμών. Τα κλινικοπαθολογοανατομικά γνωρίσματα των εξεταζόμενων περιπτώσεων περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1.

Μέθοδοι

1. Κατασκευή ιστικών μικροσυστοιχιών (Tissue Microarrays)

Τα συστήματα ιστικών μικροσυστοιχιών προσφέρουν τη δυνατότητα ταυτόχρονης μελέτης νεοπλασμάτων προερχόμενων από διαφορετικούς ασθενείς. Μέσω μιας συγχρονικά κινούμενης τράπεζας και με ένα σύστημα δότη-δέκτη αποκόπτονται και εμφυτεύονται πολλαπλοί ιστικοί κύλινδροι σε ένα κύβο παραφίνης συμπυκνώνοντας δραματικά το χώρο, το χρόνο και το κόστος των ανοσοϊστοχημικών και μοριακών διερευνήσεων, ενώ παράλληλα συγκροτείται μια τεράστια βάση ιστικών δεδομένων σε ελάχιστο αποθηκευτικό χώρο.

Στη συγκεκριμένη μελέτη και αφού προηγουμένως σημάνθηκαν οι θέσεις ενδιαφέροντος στα πλακίδια με ένα συμβατικό μικροσκόπιο (Olympus BX-50, USA), χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ATA 100 (Chemicon International, CA, USA). Συγκροτήθηκε ένας κύβος παραφίνης με ενσωματωμένο το σύνολο των 50 όγκων και των 10 μαρτύρων σε παραλληλογραμμική

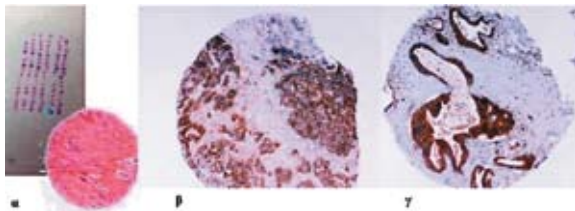
Πίνακας 1. Κλινικοπαθολογοανατομικά γνωρίσματα των περιστατικών

		n=50	%
Φύλο	Άρρεν	29	58
	Θήλυ	21	42
Αν Προέλευση	Κεφαλή	41	82
	Σώμα	5	10
	Ουρά	4	8
Διαφοροποίηση	1	10	20
	2	20	40
	3	20	40
Σταδιοποίηση	I	9	18
	II	5	10
	III-IV	36	72

διάταξη 6 ιστικών κυλίνδρων διαμ 1 mm ανά σειρά (20 σειρές: δύο ιστικοί κύλινδροι ανά περιστατικό). Επακολούθησε μικροτόμηση σε τομές πάχους 2-3 μm . Η ιστοχημική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τη χρώση Ηωσίνη-Αιματοξυλίνη (H&E). Κατά τη μικροσκόπηση επιβεβαιώθηκε η επάρκεια όλων των εξεταζόμενων περιστατικών, καθώς το καθένα αντιπροσωπεύονταν από έναν ή δύο ιστικούς κυλίνδρους (Εικ. 1).

2. Ανοσοϊστοχημεία (IHC)

Για τη διερεύνηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των γονιδίων HER2/neu και PTEN επιλέχθηκαν τα αντισώματα mouse monoclonal anti-HER2/neu (TAB 250-In Vitrogen/Zymed, USA) σε αραιώση 1:70 και rabbit polyclonal anti-PTEN (PN37-In Vitrogen/Zymed, USA) σε αραιώση 1:60. Τα αντισώματα αυτά αναγνωρίζουν το εξωκυττάριο τμήμα του ογκογονιδίου και το καρβοξυτελικό άκρο του ογκοκατασταλτικού γονιδίου, αντίστοιχα. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικής μεθόδου δύο σταδίων (En Vision-two step method) σε ιστικές τομές των 3 μm , τοποθετημένες αρχικά σε κλίβανο και θερμοκρασία 37°C. Σύμφωνα με την τεχνική και αφού προηγήθηκε αποπαραφίνωση, προοδευτική ενυδάτωση και αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης, η επώαση των τομών με τα αντισώματα πραγματοποιήθηκε σε χρονικό διάστημα 30 min, ενώ επακολούθησε η δέσμευσή τους σε ένα πολυμερές δεξτράνης σημασμένο με υπεροξειδάση (Horseradish peroxidase labeled polymer-HRP LP) για χρονικό διάστημα 20 min σε θερμοκρασία 25°C (EDTA-PH 8.0). Επακολούθησε η ενστάλαξη στις τομές δια-



Εικόνα 1. Ιστικοί κύλινδροι διαμ. 1mm (αρχική μεγέθυνση 10x). **α.** Χρώση H&E. **β.** Υπερέκφραση του γονιδίου HER2/neu (score 3+ ισχυρή, συνεχής κυτταρομεμβρανική χρώση). **γ.** Ισχυρή έκφραση του γονιδίου PTEN (διάχυτη, αδρή κυτταροπλασματική επεκτεινόμενη στην κυτταρική μεμβράνη χρώση).

λύματος 3,3-τετραυδροχλωρικής διαμινοβενζιδίνης (DAB) για χρονικό διάστημα 5 min (χρωμογόνο για οπτικοποίηση της σύνδεσης αντιγονικού επιτόπου-αντισώματος), αντίχρωση με εμβάπτιση σε διάλυμα αιματοξυλίνης, προοδευτική αφυδάτωση, εμβάπτιση σε ξυλόλη και επικάλυψη. Η όλη διαδικασία, η οποία βασίζεται στην παράκαμψη της δέσμευσης με τη βιοτίνη –το πάγκρεας παράγει μέτριες ποσότητες ενδογενούς βιοτίνης σε σχέση με άλλα όργανα, όπως το ήπαρ- αποδίδοντας καθαρότερο υπόστρωμα, πραγματοποιήθηκε με το αυτόματο μηχάνημα ανοσοϊστοχημείας I-6000 (Biogenex, USA). Ως αποδεκτή κρίθηκε η κυτταρομεμβρανική και υπομεμβρανική κυτταροπλασματική χρώση για το HER2/neu, ενώ για το PTEN η κυτταροπλασματική χρώση (Εικ. 2α). Ως μάρτυρες προτύπου ανοσοχρώσης χρησιμοποιήθηκαν ιστικά δείγματα αδενοκαρκινώματος μαστού με έκφραση των προαναφερθέντων μορίων, όπως προτείνουν οι αντίστοιχοι πάροχοι των αντισωμάτων. Η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης βασίστηκε σε συνδυασμό συμβατικής (ποιοτικής) και αναλυτικής (ποσοτικής) εκτίμησης (Πίνακας 2α).

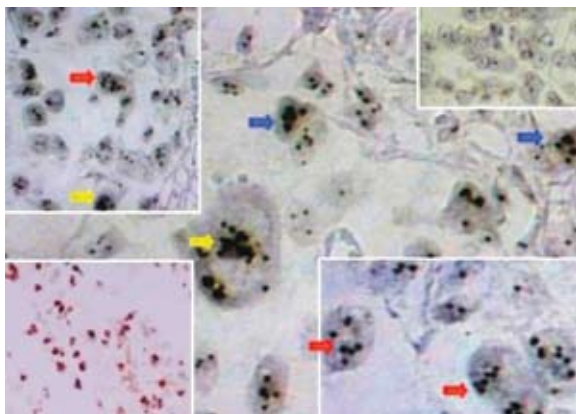
3. Χρωμογόνος *in situ* Υβριδισμός (CISH)

Η μελέτη της αστάθειας του χρωμοσώματος 17, καθώς και της ειδικής γονιδιακής αστάθειας του υποδοχέα HER2/neu πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του Χρωμογόνου *in situ* Υβριδισμού (Chromogenic *In situ* Hybridization-CISH). Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο CISH SPOTLIGHT (In Vitrogen/Zymed, USA) και χρησιμοποιήθηκαν ο ιχνηθέτης του γονιδίου (digoxigenin-labeled HER2/NEU amplification probe) καθώς και η κεντρομερής μήλη (αλληλουχίες α-δορυφορικού DNA) του χρωμοσώματος 17 (biotin-labeled centromeric probe-Zymed kit). Τα πλακίδια τοποθετήθηκαν στον κλίβανο και στους 37°C, ενώ για 2-4 ώρες η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 60°C. Την αποπαραφίνωση και προθέρμανση των τομών με δράση του ενζύμου πεψίνη διαδέχθηκε η αφυδάτωση, η αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA και εν συνεχεία ο υβριδισμός σύμφωνα με την αξιωματική αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37°C και για χρονικό διάστημα 12-48 ωρών (overnight). Την ενσωμάτωση του βιοτυλιωμένου κεντρομερούς ιχνηθέτη ακολούθησε έκ-

πλωση και σύνδεση με το σύμπλοκο υπεροξειδάσης-στρεπταβιδίνης (HRP), ενώ του ειδικού γονιδιακού ιχνηθέτη σύνδεση με πολυμερές και εν συνεχεία οι συνδέσεις αυτές σημάθηκαν με 3,3-τετραϋδροχλωρική διαμινοβενζιδίνη (DAB) ως χρωμογόνο. Επακολούθησε αντίχρωση με αιματοξυλίνη, έκπλυση, αφυδάτωση και εμποτισμός σε ξυλόλη για τελική επικάλυψη. Τα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων και τα αντίγραφα των γονιδιακών θέσεων ανιχνεύονται ως πυκνοχρωματικές καφέ ή μπλε στίξεις (dots) - μεμονωμένες (scattered) ή διατασσόμενες σε μικρού ή μεγάλου μεγέθους αθροίσεις (clusters) - στο περιβάλλον του πυρήνα (Εικ. 2β) και η αποτίμησή τους πραγματοποιείται σύμφωνα με τον πίνακα αξιολόγησης (CISH evaluation guidelines-Πίνακας 2β).

4. Υπολογιστική μορφομετρική μελέτη (Computerized Image analysis)

Η ποσοτική μέτρηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών HER2/neu (περιπτώσεις ποιοτικά χαρακτηριζόμενες ως 2+, 3+) και PTEN πραγματοποιήθηκε στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του 417 ΝΙΜΤΣ με Ημιαυτόματο Σύστημα Ανάλυσης Εικόνας DIS (Image



Εικόνα 2. Ανίχνευση αριθμητικής αστάθειας ογκογονιδίου HER2/neu με την εφαρμογή του Χρωμογόνου in situ Υβριδισμού. Μεγάλου μεγέθους συσσωματώματα αντιγράφων γονιδίου (μπλε βέλη), μεμονωμένα ή μικρού μεγέθους συσσωματώματα αντιγράφων γονιδίου (κόκκινα βέλη), μεικτό πρότυπο με μεμονωμένα και διατασσόμενα σε συσσωματώματα αντίγραφα γονιδίων (κίτρινα βέλη). Φυσιολογικό πρότυπο (2 σήματα ανά πυρήνα-Δεξιά άνω) και Υψηλού βαθμού ενίσχυση σε αδενοκαρκίνωμα του μα-στός (Αριστερά κάτω).

Πίνακας 2.

A. Εκτίμηση ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Ποιοτική αξιολόγηση ανοσοϊστοχημικής χρώσης HER2/neu

- 0 Απώλεια χρώσης ή χρώση <10% των κυττάρων
- 1+ Ομοιογενώς κατανομημένη αχνή, τμηματική χρώση >10% ή ετερογενής >50%
- 2+ Ομοιογενώς κατανομημένη εμφανής περιγεγραμμένη χρώση >10% ή ετερογενής >50%
- 3+ Ομοιογενώς κατανομημένη, ισχυρή, αδρή περιγεγραμμένη χρώση >10% ή ετερογενής >50%

Ποσοτική αξιολόγηση ανοσοϊστοχημικής χρώσης HER2/neu (ομάδα υπερέκφρασης 2+, 3+)

- Μέτρια επίπεδα ανοσοχρώσης: τιμές έντασης ανοσοχρώσης 101-130
- Υψηλά επίπεδα ανοσοχρώσης: τιμές έντασης ανοσοχρώσης 0-100

B. Εκτίμηση σημάτων χρωμογόνου in situ υβριδισμού

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΗΜΑΤΩΝ ΚΕΝΤΡΟΜΕΡΩΝ ΣΗΜΑΤΑ ΑΝΑ ΠΥΡΗΝΑ

1	ΜΟΝΟΣΩΜΙΑ
2	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ
3 --5	ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΑ

* >50% των μετρούμενων πυρήνων του κυτταρικού πληθυσμού (συμβατικά)

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΣΗΜΑΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΗΜΑΤΑ ΑΝΑ ΠΥΡΗΝΑ

2	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ
1 ή 3--5	ΠΙΘΑΝΗ (DELETION) ΔΙΑΓΡΑΦΗ ΕΛΕΓΧΟΣ ΧΡΩΜ 7 ή 17 ΓΙΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΑΣ
6--10#	ΧΑΜΗΛΗ (LOW) ΕΝΙΣΧΥΣΗ (AMPLIFICATION) ΕΛΕΓΧΟΣ ΧΡΩΜ 7ή 17 ΓΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟ ΑΝΕΥΠΛΟΕΙΔΙΑΣ
>10#	ΥΨΗΛΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ (HIGH) (AMPLIFICATION)

μεμονωμένα σήματα ή ομάδες (clusters)

*>50% των μετρούμενων πυρήνων του κυτταρικού πληθυσμού(συμβατικά)

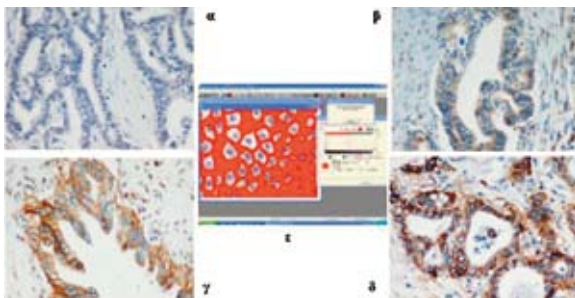
Analysis System: Intel Pentium IV/ CAMERA MICROWAVE SYSTEMS (800X600), Matrox II FRAMEGRABBER, Μικροσκόπιο Olympus BX-50- Λογισμικό: Windows XP/Image Pro Plus

version 3.0-Media Cybernetics 1997).

Σε κάθε ανοσοϊστοχημική τομή επιλέχθηκαν 5 αντιπροσωπευτικά πεδία υπό μεγέθυνση 40x και μετρήθηκε η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης (staining intensity) τόσο της ειδικής μεμβρανικής όσο και κυτταροπλασματικής έκφρασης των εξεταζόμενων πρωτεϊνών, αφού προηγουμένως κατασκευάστηκε η αντίστοιχη μακροεντολή σε BasicProPlus για τον καθορισμό του χρωματικού εύρους (στην προκειμένη περίπτωση αποχρώσεις του καφέ χρώματος της DAB) κατά το πρότυπο RGB (Red/Green/Blue). Το εύρος της έντασης της χρώσης εκτείνεται σε ένα φάσμα 256 συνεχόμενων τιμών (0-255), όπου το 0 αντιπροσωπεύει το απόλυτο μαύρο και το 255 το απόλυτο λευκό στο γκρί φάσμα του υπολογιστικού συστήματος που χρησιμοποιήθηκε (Gray scale BPP 8 bit 0-255). Το κάθε εικονοστοιχείο (pixel) στη μετρούμενη εικόνα λαμβάνει μια τιμή που αντιπροσωπεύει ακριβώς τη συνισταμένη των προαναφερθέντων βασικών χρωμάτων. Η ψηφιοποιημένη εικόνα του μικροσκοπίου καταλάμβανε σταθερό πλαίσιο μέτρησης στην οθόνη του υπολογιστή (active frame) εκτάσεως 16848 μm^2 , δηλ το $\frac{1}{4}$ περίπου του οπτικού πεδίου του μικροσκοπίου στη μεγέθυνση 40x (Εικ 3).

5. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του λογισμικού στατιστικής SPSS version 11.0. Εφαρμόστηκε η δοκιμασία Chi Square test για τη διενέργεια των συγκρίσεων μεταξύ των τιμών



Εικόνα 3. Ανίχνευση επιπέδων ανοσοϊστοχημικής χρώσης HER2/neu με την εφαρμογή υπολογιστικής ανάλυσης εικόνας. **α-δ** Διαφορετικά επίπεδα έκφρασης (score 0, 1+, 2+, 3+ αντίστοιχα). **ε** Η σημασμένη με κόκκινο χρώμα περιοχή αντιπροσωπεύει την κυτταρομεμβρική/υπομεμβρανική χρώση.

της έντασης της ανοσοχρώσης και των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων (φύλο, βαθμός διαφοροποίησης, στάδιο της νόσου). Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των ανωτέρω συσχετίσεων ορίστηκε $p < 0,05$. Παράλληλα εφαρμόστηκε η δοκιμασία Cohen's interrater kappa 95%CI (εύρος τιμών 0-1) για την ανάδειξη της συσχέτισης της ανοσοέκφρασης των δύο δεικτών. Τα αποτελέσματα της συνδυασμένης ανοσοϊστοχημικής και μοριακής μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μοριακή ανάλυση

Σύμφωνα με την εκτίμηση των σημάτων του υβριδισμού, σε 8/50 (16%) των περιπτώσεων παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου HER2/neu (gene amplification). Σε 3/8 περιπτώσεις ευρέθηκε υψηλού βαθμού γονιδιακή ενίσχυση, ενώ στις υπόλοιπες 5/8 χαμηλού βαθμού. Συσχετίζοντας την αστάθεια του γονιδίου με το βαθμό διαφοροποίησης και το στάδιο της νόσου δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p=0.326$ και $p=0.58$, αντίστοιχα). Από την ανάλυση της κατάστασης του χρωμοσώματος 17, ανευπλοειδία (3-5 σήματα κεντρομερών ανά πυρήνα) παρατηρήθηκε σε 19/50 (38%) των περιστατικών. Συνδυασμένη ανευπλοειδία και υψηλού βαθμού γονιδιακή ενίσχυση παρατηρήθηκαν σε 2/19 (11%) των περιστατικών. Η στατιστική επεξεργασία δεν ανάδειξε ισχυρή συσχέτιση τόσο με το βαθμό

Πίνακας 3. Αποτελέσματα (IHC-CISH) και στατιστικές συσχετίσεις

Δείκτης	n=50	Grade*	Stage*
HER2/neu γονίδιο		0,326	0.58
Φυσιολογικό	42		
Ενίσχυση	8		
Χρωμόσωμα 17		0,682	0.37
Φυσιολογικό	31		
Ανευπλοειδία	19		
HER2/neu πρωτεΐνη		0,019	0.58
Υπόέκφραση (0/1+)	40		
Υπερέκφραση (2+/3+)	10		
PTEN πρωτεΐνη		0,044	0.02
Υπόέκφραση/Απώλεια	17		
Υπερέκφραση	33		

* chi square test (p values)

διαφοροποίησης ($p=0.682$) όσο και με το βαθμό διαφοροποίησης ($p=0.37$), καθώς και με την κατάσταση του γονιδίου HER2/neu ($p=0.354$). Στην ομάδα των φυσιολογικών παγκρεατικών επιθηλίων δεν ανευρέθηκαν χρωμοσωμιακές ή γονιδιακές τροποποιήσεις.

Ανοσοϊστοχημική Ανάλυση

Σύμφωνα με τη συνδυασμένη ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του ογκογονιδίου HER2/neu, 29/50 (58%) των περιπτώσεων χαρακτηρίστηκαν ως 0 (αρνητικά), ενώ 11/50 (22%) ως 1+ (ασθενής έκφραση). Ανοσοϊστοχημικά ισχυρή έκφραση παρατηρήθηκε σε 10/50 (20%) των περιστατικών. Ως 3+ (ισχυρής έντασης, αδρή, συνεχής κυτταρομεμβρανική χρώση) χαρακτηρίστηκαν 4/10 (40%) περιστατικά, ενώ τα υπόλοιπα 6/10 (60%) ως 2+ (μέτριας έντασης, αδρή, συνεχής κυτταρομεμβρανική χρώση). Στατιστικά σημαντική αναδείχθηκε η συσχέτιση της πρωτεϊνικής έκφρασης με το βαθμό διαφοροποίησης του εξεταζόμενου νεοπλασματος ($p=0.019$), αλλά όχι και με το στάδιο της νόσου ($p=0,58$). Παράλληλα, η πρωτεϊνική έκφραση συσχετίστηκε με την κατάσταση του γονιδίου ($p=0,006$). Η πρωτεϊνική έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου PTEN (κυτταροπλασματική, διάχυτη, επεκτεινόμενη σε διάφορο βαθμό προς την κυτταρική μεμβράνη) παρατηρήθηκε μειωμένη ή απύουσα σε 17/50 (34%) των περιστατικών, ενώ στα υπόλοιπα 33/50 (66%) κυμάνθηκε σε μέτρια έως ισχυρά επίπεδα έντασης της ανοσοχρώσης. Η έκφραση του PTEN συσχετίστηκε οριακά με το βαθμό διαφοροποίησης ($p=0,044$), αλλά ισχυρά με το στάδιο της νόσου ($p=0,02$).

Ιδιαίτερη παρατήρηση αποτελεί η ταυτόχρονη υπερέκφραση του HER2/neu με απώλεια/υποέκφραση του PTEN, η οποία παρατηρήθηκε σε 7 όγκους, 6 εκ των οποίων εμφάνιζαν ενίσχυση του γονιδίου HER2/neu (overall 95% CI kappa=0,12). Τέλος, στην ομάδα των φυσιολογικών παγκρεατικών επιθηλίων ανευρέθη ένα περιστατικό με μέτρια υπερέκφραση του HER2/neu, καθώς και δύο με μειωμένη ένταση χρώσης του PTEN.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συνδυασμένη ανοσοϊστοχημική και μοριακή μελέτη σε ιστικές μικροσυστοιχίες πορογενών αδενοκαρκινωμάτων παγκρέατος

κατέδειξε σημαντική αλληλεξάρτηση της πρωτεϊνικής έκφρασης των εξεταζόμενων γονιδίων HER2/neu και PTEN. Η υπερέκφραση του πρώτου παρατηρήθηκε σε μικρότερο ποσοστό (20%) από ότι συμβαίνει στο αδενοκαρκίνωμα του μαστού (~30-35%) και συσχετίστηκε με μία παράμετρο της βιολογικής συμπεριφοράς του νεοπλασματος (βαθμός διαφοροποίησης). Μελέτες της έκφρασης του HER2/neu στο αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος καταλήγουν σε αντικρουόμενες στατιστικές συσχετίσεις^{17,18}. Η ανάλυση των αριθμητικών παραλλαγών του γονιδίου καταδεικνύει ότι η ενίσχυση (υψηλού ή χαμηλού βαθμού), παρά το γεγονός ότι δε συσχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης ή το στάδιο της νόσου, αποτελεί σημαντικό γενετικό συμβάν. Νεώτερες μελέτες με πρότυπο το αδενοκαρκίνωμα του μαστού αλλά και του παχέος εντέρου προτείνουν ότι η ανταπόκριση στις νεότευκτες στοχευμένες θεραπείες, που περιλαμβάνουν μονοκλωνικά αντισώματα-αποκλειστές της εξωκυτάριας δομής του υποδοχέα ή μικρού μοριακού βάρους μόρια-αναστολείς των τυροσιναινασινικών αλληλουχιών, εξαρτάται όχι από τα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης αλλά από το μηχανισμό της γονιδιακής απορρύθμισης υποδοχέων όπως οι HER2/neu και EGFR^{19,20}. Ασθενείς πάσχοντες από τους προαναφερόμενους τύπους καρκίνου καρπώθηκαν οφέλη προσδόκιμου επιβίωσης, ποιότητας ζωής και ανταπόκριση στη συμβατική χημειοθεραπεία (κυρίως με αναστολείς της δράσης των Τοποισομερασών I-II πχ irrinotecan, anthracyclines-doxorubicin) όταν ταυτοποιήθηκε σε αυτούς με μοριακή ανάλυση (PCR, FISH, CISH) η ενίσχυση των αντίστοιχων γονιδίων. Ασθενείς στους οποίους ο μηχανισμός απορρύθμισης διέφερε (σημειακή μετάλλαξη, διαγραφή γονιδίου) και παρά το γεγονός ότι ανοσοϊστοχημικά παρατηρήθηκε υπερέκφραση του αντίστοιχου μορίου παρουσίασαν πτωχή πρόγνωση και χημειοανταπόκριση²¹.

Σε αντίθεση με το διηθητικό αδενοκαρκίνωμα του μαστού, όπου η ανοσοϊστοχημική υπερέκφραση του HER2/neu (2+, 3+) οφείλεται κυρίως στην ενίσχυση του γονιδίου, στο εξεταζόμενο πορογενές αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος αναγνωρίστηκαν περιπτώσεις ενίσχυσης του γονιδίου χωρίς πρωτεϊνική υπερέκφραση (score 1+), ακόμη και με απουσία της ανοσοχρώσης (score 0). Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην αναζήτηση άλλων μηχανισμών τροποποίησης του ογκογονιδίου κατά

την καρκινογενετική διαδικασία του οργάνου, εμπλέκοντας και την αστάθεια του χρωμοσώματος 17 που το φιλοξενεί²².

In vitro και in vivo μελέτες της ανταπόκρισης σε θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα- αποκλειστές της εξωκυττάριας δομής του μορίου (trastuzumab) κατέδειξαν σε καρκίνους, όπως του στομάχου, του πνεύμονα ή ακόμη και του παγκρέατος θετικά αποτελέσματα, ειδικά σε υποομάδες ασθενών ή πειραματοζώων που πληρούσαν το μοριακό κριτήριο της γονιδιακής ενίσχυσης (gene amplification)²³⁻²⁵. Όμως σε σημαντική υποομάδα ασθενών (~35%) πασχόντων από αδενοκαρκίνωμα του μαστού και παρά το γεγονός της συνδυασμένης πρωτεϊνικής υπερέκφρασης/γονιδιακής ενίσχυσης του μορίου παρατηρείται αυξημένη χημειοαντοχή, επιπλοκές κατά τη συμβατική προαναφερόμενη χημειοθεραπεία (καρδιο-μυελοτοξικότητα) και πτωχή πρόγνωση κατά την εφαρμογή των σχημάτων στοχευμένων θεραπειών^{26,27}. Μία πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε το ζήτημα αυτό συσχετίζοντας τη δράση του HER2/neu με την αντίστοιχη του ογκοκατασταλατικού γονιδίου PTEN²⁸. Οι ερευνητές αναλύοντας τόσο τη γονιδιακή κατάσταση όσο και τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου κατέληξαν στην παραδοχή ότι η λειτουργική έκπτωση του γονιδίου που αντανάκλα στη μειωμένη πρωτεϊνική παραγωγή του ευθύνονται για την αντίσταση του νεοπλασματος στη στοχευμένη μονοκλωνική αγωγή.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες το ογκοκατασταλατικό γονίδιο PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on 10q23) αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του συστήματος μεταγωγής σημάτων προς τον πυρήνα PI3-K/Akt/Mtor, αποφωσφορυλιώνοντας τις κινάσες Src και PI3K, οι οποίες ενεργοποιούμενες επάγουν την ογκογόνο δράση του HER2/neu αποστέλλοντας διαρκή και ανεξέλεγκτα μιτογόνα σήματα προς τον πυρήνα²⁹. Απώλεια της γονιδιακής λειτουργίας λόγω σημειακής μετάλλαξης, απώλειας της ετεροζυγωτίας (LOH) ή επιγενετικών τροποποιήσεων (epigenetic downmodulation) οδηγεί σε έλλειψη της παραγόμενης πρωτεΐνης και η αδυναμία μετακίνησής της προς την κυτταρική μεμβράνη στερεί το υπόστρωμα πρόσδεσης του μονοκλωνικού αντισώματος και του αποκλεισμού της εξωκυττάριας δομής του υποδοχέα HER2/neu³⁰. Στον καρκίνο του παγκρέατος η πρωτεϊνική υπερέκφραση δεν οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη, αλλά σε μη-

χανισμούς όπως διαταραχή της μεθυλίωσης του προαγωγέα του γονιδίου ή σε μετα-μεταγραφικές (m RNA) τροποποιήσεις, όπως συμβαίνει και στο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα^{31,32}.

Στην παρούσα μελέτη η διερεύνηση της συσχέτισης των απορρυθμίσεων των δύο μορίων HER2/neu και PTEN προτείνει ένα αξιόπιστο σχήμα εξήγησης του ρόλου που διαδραματίζει το δεύτερο στην προοπτική εφαρμογής στοχευμένης θεραπείας στο πορογενές αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος. Η υποέκφραση ή απουσία της πρωτεϊνικής έκφρασης του PTEN στις περιπτώσεις της γονιδιακής ενίσχυσης του HER2/neu στερεί πιθανόν τη δράση της σύνδεσης του μονοκλωνικού αντισώματος στον υποδοχέα, μέσω του μηχανισμού που περιγράφεται ανωτέρω προσεγγίζοντας το πρότυπο του αδενοκαρκινώματος του μαστού. Κατά συνέπεια από τις περιπτώσεις με γονιδιακή ενίσχυση του HER2/neu (n=8), έξι συνδέονται με χαμηλά επίπεδα έκφρασης του PTEN και συνεπώς με αδυναμία προρρορισμού κλινικού οφέλους από την εφαρμογή της στοχευμένης αυτής θεραπείας. Για τις εναπομείνουσες δύο περιπτώσεις που χαρακτηρίζονται από φυσιολογική έκφραση του μορίου προβάλλει ως πιθανή η εφαρμογή της ανωτέρω θεραπευτικής προσέγγισης, αφού όμως ελεγχθούν τα επίπεδα των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο εν λόγω μοριακό μονοπάτι.

Η προσέγγιση του ζητήματος της εφαρμογής στοχευμένων θεραπειών που ήδη έχουν εγκριθεί σε καρκίνους όπως του μαστού, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα και δυνητικά του παγκρέατος απαιτεί επιτακτικά την αναθεώρηση της παθολογοανατομικής έποψης. Παρά το γεγονός ότι η ανοσοϊστοχημεία εξακολουθεί να αποτελεί μια διαδικασία καθημερινής διερεύνησης της έκφρασης των μορίων, εν τούτοις ως μέθοδος εμπίπτει σε περιορισμούς ή τεχνικής φύσεως κωλύματα (ποιότητα μονιμοποίησης που αντανάκλα τη διατήρηση των αντιγονικών επιτόπων, διαφορετικά αντισώματα και πρωτόκολλα ανοσοχρώσης, υποκειμενική εκτίμηση του αποτελέσματος)³³. Για την πληρέστερη αντίληψη των τροποποιήσεων που υφίστανται κριτικά γονίδια όπως οι υποδοχείς EGFR, HER2/neu, VEGFR απαιτείται η μοριακή διερεύνηση. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε ο Χρωμογόνου in situ Υβριδισμός (CISH). Η μοριακή αυτή τεχνική αποτελεί μια παραλλαγή του κλασσικού Υβριδισμού, εκμεταλλευόμενη μια διαδικασία τύπου ανο-

σοιστοχημείας και παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης της αριθμητικής χρωμοσωμιακής ή ειδικής γονιδιακής κατάστασης, εντάσσοντας τα σήματα των δομών τους στο πυρηνικό περιβάλλον. Προσφέρει σε αντίθεση με τον Φθορίζοντα Υβριδισμό (FISH) τη δυνατότητα συνεκτίμησης γενετικής και ιστολογικής εικόνας σε μικρές μεγεθύνσεις (20x, 40x) και σε συμβατικά μικροσκόπια και τα παραγόμενα πλακίδια αποθηκεύονται όπως τα χρωσθέντα ανοσοιστοχημικά³⁴. Μελέτες σύγκρισης των αποτελεσμάτων, όπως προκύπτουν από την εφαρμογή των δύο αυτών μεθόδων, καταδεικνύουν υψηλά ποσοστά συσχέτισης (concordance 95-98%)^{35,36}. Παράλληλα η εφαρμογή νέων τεχνολογιών όπως τα συστήματα ιστικών ή γονιδιακών μικροσυστοιχιών (tissue or cDNA microarrays) και η υπολογιστική ανάλυση εικόνας επεκτείνουν τις δυνατότητες της σύγχρονης Παθολογικής Ανατομικής με το σχεδιασμό και υλοποίηση πολυπαραγοντικών μελετών σε μεγάλο αριθμό περιπτώσεων, καθώς και την ακριβή, ταχεία διαχείριση των εξαγομένων δεδομένων, αντίστοιχα³⁷⁻³⁹.

Συμπερασματικά η μελέτη αυτή - μέρος της οποίας έχει γίνει αποδεκτό για δημοσίευση σε διεθνή έγκριτα ιατρικά περιοδικά - παρουσιάζει ένα πρότυπο περισσότερο ορθολογικής διαχείρισης ασθενών πασχόντων από πορογενές αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος με εστίαση στην πιθανή στοχευμένη anti-HER2/neu θεραπεία⁴⁰. Ένα κλάσμα πασχόντων από πορογενές αδενοκαρκίνωμα του παγκρέατος πληροί τα μοριακά κριτήρια (ενίσχυση ογκογονιδίου HER2/neu και όχι ανοσοέκφραση) για εφαρμογή θεραπείας με μονοκλωνικά αντισώματα. Η ταυτόχρονη όμως απορρύθμιση του PTEN πιθανότατα στερεί σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το αδενοκαρκίνωμα του μαστού την ευαισθησία στη συγκεκριμένη θεραπεία, διότι λόγω της αποσταθεροποίησης του PTEN δεν επάγεται η κατασταλτική δράση του μονοκλωνικού αντισώματος στο σύστημα μεταγωγής σημάτων προς τον πυρήνα PI3-K/Akt.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς επιθυμούν να ευχαριστήσουν την κα Τζουμακάρη Π. και τον κ Βηλαρά Γ. για την ποιότητα της τεχνικής εργασίας τους (κατασκευή ιστικών μικροσυστοιχιών και διενέργεια ανοσοιστοχημείας/υβριδισμού, αντίστοιχα). Επίσης επιθυμούν να ευχαριστήσουν

την κα Γιάννακου Ο., Παθολογοανατόμο και τον κ Δερβένη Χ., Γεν. Χειρουργό στο ΠΓΝΑ "Αγία Όλγα" για την παροχή μέρους του εξεταζόμενου βιοπτικού υλικού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Klopel G, Hruban RH, Longencker DS: Ductal adenocarcinoma of the pancreas, in Hamilton SR, Aatonen LA: Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System. WHO Classification Of Tumors. France IARC Press Lyon, 2000: 221-230.
2. Sohn TA, Yeo CJ. The molecular genetics of pancreatic ductal carcinoma: a review. *Surg Oncol* 9(3): 95-101, 2000.
3. Ernst Heinmøller, Wolfgang Dietmaier, Hubert Zirngibl. Molecular Analysis of Microdissected Tumours, and Preneoplastic Intraductal Lesions in Pancreatic Carcinoma. *Am J Pathol* 157:83-92, 2000.
4. A Moskovitz, N Linford, T Brentnall, M Bronner, B Storer, J Potter et al. Chromosomal Instability in Pancreatic Ductal Cells from patients with Chronic Pancreatitis and Pancreatic Adenocarcinoma. *Genes, Chrom& Cancer* 37:201-206, 2003.
5. Luttges J, Galehdari H, Brocker V, Schwarte-Waldhoff I, Henne-Bruns D, Kloppel G et al. Allelic loss is often the first hit in the biallelic inactivation of the p53 and DPC4 genes during pancreatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 158(5): 1677-83, 2001.
6. B Nakata, Y Q Wang, M Yashiro, N Nishioka, H Tanaka, M Ohira et al. Prognostic Value of Microsatellite Instability in Resectable Pancreatic Cancer. *Clin Cancer Research* 8: 2536-2540, 2002.
7. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-Related Cancer* 11: 689-708, 2004.
8. Earp HS, Calvo BF, Sartor CI. The EGF receptor family—multiple roles in proliferation, differentiation, and neoplasia with an emphasis on HER4. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 114: 315-333, 2003.
9. Hanna WM, Kahn HJ, Pienkowska M et al. Defining a test for HER2/neu evaluation in breast cancer in the diagnostic setting. *Mod Pathol* 14: 677-685, 2001.
10. Vera-Roman JM, Rubio-Martinez LA. Comparative assays for the HER2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 128: 627-632, 2004
11. Janmaat ML, Giaccone G. The epidermal growth factor receptor pathway and its inhibition as anti-cancer therapy. *Drugs Today (Barc)* 3(39) Suppl C:61-80, 2003.

12. Alberston DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumours. *Nat Genet* 34: 369-376, 2003.
13. Wang S, Hossein-Saboorian M, Frenkel EP et al. Aneusomy 17 in breast cancer: its role in HER2/neu protein expression and implication for clinical assessment of HER2/neu status. *Mod Pathol* 15: 137-145, 2002.
14. Seidman A, Fournier M, Esteva F, Tan L, Kaptain S, Bach A et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol* 19: 2587-2595, 2001.
15. Thor A, Liu S, Edgerton S et al. Activation (tyrosine phosphorylation) of erb-2: a study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J Clin Oncol* 18: 3230-3239, 2002.
16. Edgerton SM, Moore D, Merkel D, Thor AD. Erb-2 (HER-2) and breast cancer progression. *Appl Immunohistochem Morphol* 11(3): 214-21, 2003.
17. Zhang L, Yuan SZ. Expression of c erb2 oncogene protein, epidermal growth factor receptor and TGF-beta 1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 1(4): 620-3, 2002.
18. Safran H, Steinhoff M, Mangray S, Rathore R, King TC, Chai L et al. Overexpression of the HER2/ neu oncogene in pancreatic adenocarcinoma. *Am J Clin Oncol* 24(5): 496-99, 2001.
19. Stoecklein NA, Luebke AM, Erbesdobler A, Knoefel W, Schraut W, Verde PE, et al. Copy number of chromosome 17 but not HER2 amplification predicts clinical outcome of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 22:4737-4745, 2005.
20. Buchler P, Reber HA, Buchler MC et al. Therapy for pancreatic cancer with a recombinant humanized anti-HER2 antibody. *J Gastrointest Surg* 5: 139-146, 2001.
21. Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy — focus on cetuximab. *European Journal of Cancer* 37 (Suppl 4) S16–S22, 2001.
22. Krempien R, Munter MW, Huber PE, Nill S, Friess H, Timke C et al. Randomized Phase II-Study evaluating EGFR targeting therapy with cetuximab in combination with radiotherapy and chemotherapy for patients with locally advanced pancreatic cancer-PARC study protocol. *BMC Cancer* 11;5 (1): 131, 2005.
23. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, Kapanen AI, Tommola S, Soini Y et al. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 16(2): 273-8, 2005.
24. Tan D, Deeb G, Wang J, Slocum HK, Winston J, Wiseman S et al. HER-2/neu protein expression and gene alteration in stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: a study of 140 cases using a combination of high throughput tissue microarray, immunohistochemistry, and fluorescent in situ hybridisation. *Diagn Mol Pathol* 12(4): 201-11, 2003.
25. Buchler P, Reber HA, Buchler MC et al. Therapy for pancreatic cancer with a recombinant humanized anti-HER2 antibody. *J Gastrointest Surg* 5: 139-146, 2001.
26. Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA et al: Evaluating HER2 amplification in breast cancer. *J Pathol* 422-428, 2001.
27. Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z et al. Determination of HER2 gene amplification by Chromogenic in situ hybridization (CISH) in breast cancer. *Mod Pathol* 15 (6): 657-65, 2002.
28. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts resistance in patients. *Cancer Cell* 6: 117-127, 2004.
29. Cattaneo M, Fontanella E, Canton C, Delia D, Biunno I. SEL1L affects human pancreatic cancer cell cycle and invasiveness through modulation of PTEN and genes related to cell-matrix interactions. *Neoplasia* 7(11):1030-8, 2005.
30. Maitra A, Hruban RH. A new mouse model of pancreatic cancer: PTEN gets its Akt together. *Cancer Cell* 8(3): 171-2, 2005.
31. Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SA. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 23(53):8571-80, 2004.
32. Farrow B, Evers BM. Activation of PPARgamma increases PTEN expression in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 301(1): 50-3, 2003.
33. Ebert MP, Fei G, Schandl L, Mawrin C, Dietzmann K, Herrera P et al. Reduced PTEN expression in the pancreas overexpressing transforming growth factor-beta 1. *Br J Cancer* 86(2):257-62, 2002.
34. Tanner M, Gancberg D, Di Leo et al. Chromogenic in situ hybridization : a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol* 1467-1472, 2002.
35. Arnould L, Denoux Y, McGrogan G et al. Agreement between Chromogenic in situ hybridization (CISH) and FISH in the determination of HER2/neu status in breast cancer. *Br J Cancer* 1587-1591, 2003.
36. Kakar S, Puangsuwan N, Stevens JM et al. HER2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization: comparison of results and correlation with

- survival. *Mol Diagn* 5:199-207, 2000.
37. Harada T, Okita K, Shiraishi K et al. Interglandular cytogenetic heterogeneity detected by comparative genomic hybridization in pancreatic cancer. *Cancer Res* 62: 835-839, 2002.
38. Camp RL, Dolled-Filhart M, King BL, Rimm DL. Quantitative analysis of breast cancer tissue microarrays shows that both high and normal levels of HER2/neu expression are associated with poor outcome. *Cancer Res* 63(7):1445-1448, 2003.
39. Gil J, Wu H, Wang B. Image analysis and Morphometry in the diagnosis of breast cancer. *Microsc Res and Tech* 59:109-118, 2002.
40. Tsiambas E, Karameris A, Dervenis Ch, Lazaris AC, Giannakou N, Gerontopoulos K et al. HER2/neu expression and gene alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma: A comparative immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization study based on tissue microarrays and computerized image analysis. *JOP* 7(3): 283-294, 2006.

Corresponding author:

Evangelos Tsiambas, Cytopathologist, MD, PhD
17 Patriarchou Grigoriou str,
AG Paraskevi, 15341, Athens, Greece
Tel/Fax: 00302106526259
e mail: tsiambasecyto@yahoo.gr

Υπεύθυνος αλληλογραφίας:

Ευάγγελος Τσιάμπας, Κυτταρολόγος, MD, PhD
Πατριάρχου Γρηγορίου Ε' 17
Αγ Παρασκευή Αττ, 15341
Τηλ/φάξ: 00302106526259
e mail: tsiambasecyto@yahoo.gr