

3. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του EGFR και VEGF στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και η συσχέτισή τους με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.

Ε. Σκαφίδα¹, Χ. Γλαβά¹, Ε. Μούστου¹, Ξ. Γραμματόγλου¹, Κ. Μανωλουδάκη¹, Δ. Ζήσης², Θ. Βασιλακάκη¹.

¹ Παθολογοανατομικό εργαστήριο, «Τζάνειο» ΓΝΠ

² Γαστρεντερολογική κλινική, «Τζάνειο» ΓΝΠ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι υπεύθυνος για το 10% των θανάτων κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η ανοσοϊστοχημική έκφραση του VEGF και του EGFR στο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου και η συσχέτισή τους με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

Υλικό και μέθοδος: Το υλικό μας αποτέλεσαν 90 περιπτώσεις αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου από παρασκευάσματα κολεκτομής. Από κάθε περίπτωση ελήφθησαν τομές πάχους 4μm από κύβους παραφίνης στις οποίες έγιναν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για τους δείκτες EGFR και VEGF. Πληροφορίες που αφορούσαν το φύλο, την ηλικία, το μέγεθος και την τοπογραφία του όγκου, το βαθμό διαφοροποίησης (grade), τη διηθητική ανάπτυξη, την παρουσία νέκρωσης, τη φλεγμονώδη αντίδραση, τη διήθηση αγγειακών χώρων και την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων καταγράφησαν από όλους τους ασθενείς.

Όλες οι περιπτώσεις ταξινομήθηκαν ανάλογα με την έκφραση των EGFR και VEGF σε δύο κατηγορίες που αντιστοιχούσαν στο ποσοστό των θετικώς χρωσθέντων νεοπλασματικών κυττάρων: χαμηλή ($\leq 25\%$) και υψηλή ($> 25\%$).

Η ένταση των χρώσεων αξιολογήθηκε ως ακολούθως: ασθενής, μέτρια και έντονη.

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών συσχέτισθηκε στατιστικά με όλες τις ανωτέρω παραμέτρους.

Αποτελέσματα: Το EGFR (μεμβρανική χρώση) ήταν θετικό σε 42 από τις 90 περιπτώσεις που εξετάστηκαν (47%). Το VEGF (κυτταροπλασματική χρώση) ήταν θετικό σε 81 περιπτώσεις (90%). Η ένταση των χρώσεων και για τους δύο δείκτες ήταν μέτρια έως έντονη. Όλες οι περιπτώσεις των θετικών στο VEGF καρκινωμάτων είχαν υψηλή έκφραση ($> 25\%$) και από την ομάδα των θετικών στο EGFR περιστατικών υψηλή έκφραση ($> 25\%$) παρατηρήθηκε σε 33 περιπτώσεις.

Δέν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική σχέση της έκφρασης των δεικτών EGFR και VEGF με όλες τις ανωτέρω παραμέτρους ($p > 0.05$).

Συμπέρασμα: Οι δείκτες EGFR και VEGF δεν φαίνεται να αποτελούν αξιόπιστους προγνωστικούς δείκτες στα αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου.

Λέξεις-κλειδιά: EGFR, VEGF, αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου, ανοσοϊστοχημεία

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παγκοσμίως ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι υπεύθυνος για το 10% των θανάτων κυρίως στις ανεπτυγμένες χώρες. Αποτελεί τη μεγαλύτερη ομάδα καρκίνων του γαστρεντερικού συστήματος στο Δυτικό κόσμο, είναι η δεύτερη αιτία θανάτου για τους άνδρες μετά τον καρκίνο του πνεύμονα και η τρίτη στις γυναίκες μετά τον καρκίνο του μαστού και του πνεύμονα. Ως σήμερα, σε διάφορες μελέτες

έχει χρησιμοποιηθεί πληθώρα δεικτών στην προσπάθεια να προβλέψουν τη βιολογική συμπεριφορά και να καθορίσουν τους όγκους που ανθίστανται στους διάφορους θεραπευτικούς χειρισμούς.[1,2]

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η ανοσοϊστοχημική έκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού παράγοντος ανάπτυξης (EGFR) και

του αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντος ανάπτυξης (VEGF) στα αδενοκαρκινώματα και η συσχέτιση τους με διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Το υλικό μας αποτέλεσαν 90 περιπτώσεις αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου από παρασκευάσματα κολεκτομής που εξετάστηκαν στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Τζανείου Νοσοκομείου Πειραιά τη χρονική περίοδο 2000-2005.

Πληροφορίες που αφορούσαν το φύλο,την ηλικία,το μέγεθος και την τοπογραφία του όγκου, το βαθμό διαφοροποίησης (grade),τη διηθητική ανάπτυξη, την παρουσία νέκρωσης, τη φλεγμονώδη αντίδραση,την διήθηση αγγειακών χώρων και την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων καταγράφησαν από όλους τους ασθενείς.

Τα περιστατικά αφορούσαν 54 άνδρες και 36 γυναίκες ηλικίας από 41 έως 83 ετών. Η μέγιστη διάμετρος του όγκου ήταν από 2 έως 11 εκ. Σε 12 περιπτώσεις ήταν ανωτέρας, 74 μετρίας και 4 χαμηλής διαφοροποίησης.

Ο όγκος παρουσίαζε εστίες νεκρώσεως σε 21 περιπτώσεις,σε 85 συνοδευόταν από φλεγμονώδεις διηθήσεις και σε 27 περιπτώσεις υπήρχαν λεμφαδενικές μεταστάσεις.

Όσον αφορά την τοπογραφία του όγκου 22 περιπτώσεις εντοπίζονταν στο τυφλό,σε 2 στο ανιόν,σε 7 στο εγκάρσιο,σε 3 στο κατιόν,σε 33 στο σιγμοειδές και 23 στο ορθό.

Το νεόπλασμα επεκτεινόταν και διηθούσε τον περικολικό λιπώδη ιστό σε 51 περιπτώσεις,όλο το πάχος του εντερικού τοιχώματος σε 23, τον μυϊκό χιτώνα σε 10 περιπτώσεις και σε 6 περιπτώσεις έφθανε στον υποβλεννογόνο χιτώνα.

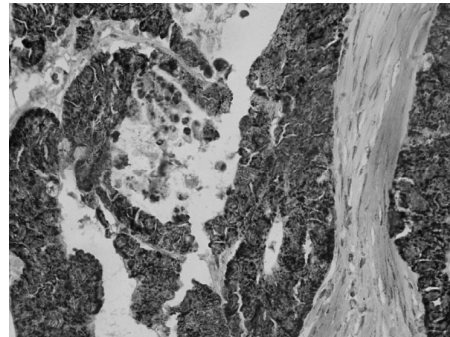
Από κάθε περίπτωση ελήφθησαν τομές πάχους 4 μm. από κύβους παραφίνης που περιέκλειαν ικανή ποσότητα νεοπλασματικής μάζας. Οι αντιοροί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: α) Mouse anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Clone:H11 της Dako σε φιαλίδιο του 1ml και αραιώση 1:80. Β) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Ab3,Clone:1H 121 της Neomarkers σε φιαλίδιο του 1ml και αραιώση 1:50.

Για την εκτίμηση της ανοσοϊσοχημικής έκφρασης του κάθε δείκτη αξιολογήθηκε η εκατοστιαία αναλογία των θετικών χρωσθέντων νεοπλασματικών κυττάρων κάθε περίπτωσης. Για την εξαγωγή του εκατοστιαίου ποσοστού μετρήθηκαν

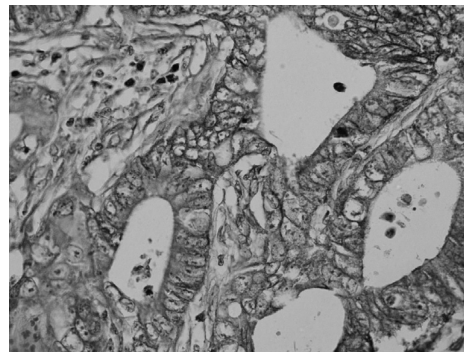
σε κάθε περίπτωση 1000 κακοήθη κύτταρα σε τυχαία οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης και οι περιπτώσεις μας ταξινομήθηκαν ανάλογα με την έκφραση των EGFR και VEGF σε δύο κατηγορίες που αντιστοιχούσαν στο ποσοστό των θετικά χρωσθέντων νεοπλασματικών κυττάρων: χαμηλή ($\leq 25\%$) και υψηλή ($\geq 25\%$). Η ένταση των χρώσεων αξιολογήθηκε ως ακολούθως: ασθενής, μέτρια και έντονη. Ακολούθως η ανοσοϊσοχημική έκφραση των ανωτέρω δεικτών συσχέτιστηκε με τις ακόλουθες παραμέτρους: φύλο, ηλικία, τοπογραφία, μέγεθος του όγκου, παρουσία νέκρωσης, φλεγμονώδης αντίδραση, διήθηση αγγειακών χώρων,διηθητική ανάπτυξη,ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων και βαθμό διαφοροποίησης. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας χρησιμοποιήθηκε το test ανεξαρτησίας χ^2 .

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των χρώσεων ήταν πολύ ικανοποιητικά. Το EGFR ήταν θετικό σε 42 από τις 90 περιπτώσεις που εξετάστηκαν (47%). Η ένταση της χρώσης ήταν από μέτρια έως έντονη και αφορούσε την κυτταρική μεμβράνη (φωτογραφίες 1-2).

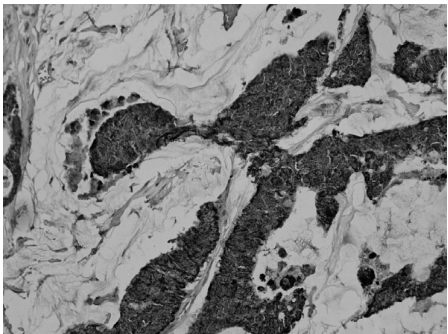


Φωτογραφία 1: ΑδενοCa παχέος εντέρου EGFRX200

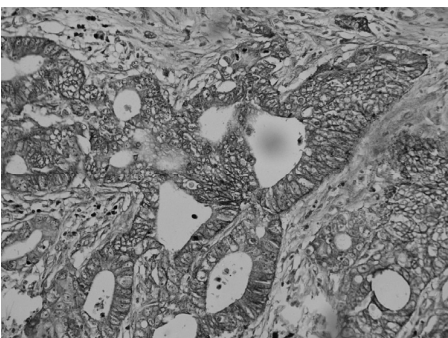


Φωτογραφία 2: ΑδενοCa παχέος εντέρου EGFRX400

Το VEGF ήταν θετικό σε 81 περιπτώσεις (90%). Η χρωστική αντίδραση ήταν κυρίως κυτταροπλασματική και η έντασή της από μέτρια έως έντονη (φωτογραφίες 3-4).



Φωτογραφία 3: ΑδενοCa παχέος εντέρου VEGFX200



Φωτογραφία 4: ΑδενοCa παχέος εντέρου VEGFX400

Όλες οι περιπτώσεις των θετικών στο VEGF είχαν υψηλή έκφραση (>25%) ενώ από την ομάδα των θετικών στο EGFR περιπτώσεων η υψηλή έκφραση (>25%) παρατηρήθηκε σε 9 και χαμηλή σε ($\leq 25\%$) σε 33.

Δέν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης των ανωτέρω δεικτών ($p > 0.05$) με το φύλο, την ηλικία, την τοπογραφία, το μέγεθος του όγκου, την ύπαρξη νέκρωσης, τη φλεγμονώδη αντίδραση, τη διήθηση αγγειακών χώρων, τη διηθητική ανάπτυξη, την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και το βαθμό διαφοροποίησης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το καρκίνωμα του παχέος εντέρου αποτελεί ένα από τα συχνότερα νεοπλάσματα, στις ανεπτυγμένες κυρίως χώρες και έχουν γίνει και γίνονται πολλές μελέτες με καινούργιους δείκτες, σε μια

προσπάθεια να προβλέψουν την πρόγνωση και να καθορίσουν, για να αντιμετωπίσουν καλύτερα, νεοπλασματικούς όγκους που ανθίστανται στη θεραπεία. [1,2]. Είναι γνωστό ότι ο υποδοχέας του επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης (EGFR) εμπλέκεται στην γένεση πολλών όγκων κατέχοντας σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό του νεοπλάσματος, την αγγειογένεση και την επέκταση-διηθητικότητα του όγκου. Όσον αφορά τα καρκινώματα του παχέος εντέρου, σε ορισμένες μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι ο EGFR δείκτης σχετίζεται με κακή πρόγνωση ενώ σε άλλες δεν έχει αποδειχθεί καμία συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του EGFR και της επιβίωσης. Επίσης έχει αναφερθεί σημαντική έκφραση του EGFR στους χαμηλής διαφοροποίησης και υψηλού σταδίου όγκους [1,2,3,4,5,6,7,8].

Η αγγειογένεση έχει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των όγκων. Είναι γνωστό ότι πολλοί παράγοντες σχετίζονται με την αγγειογένεση και ο αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας ανάπτυξης (VEGF) είναι από τους σπουδαιότερους και από τους πλέον μελετηθέντες. Σε ορισμένες δε μελέτες αναφέρεται ότι εκφράζεται στα υψηλού σταδίου καρκινώματα του παχέος εντέρου. Αν και γενικά θεωρείται ότι η έκφραση του VEGF είναι δείκτης κακής πρόγνωσης σε πολλούς τύπους νεοπλασμάτων (καρκινώματα στομάχου, ουροδόχου κύστεως, προστάτη, ήπατος, κόλπου, πλακώδη), κάτι τέτοιο δεν έχει αποδειχθεί όσον αφορά τα καρκινώματα του παχέος εντέρου [1,2,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18].

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το EGFR και το VEGF αποτελούν τους νεώτερους θεραπευτικούς στόχους για πολλούς όγκους και η χημειοθεραπεία anti-EGFR και anti-VEGF θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική θεραπεία σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου με θετική έκφραση αντίστοιχα στα EGFR και VEGF αντίστοιχα [19].

Ωστόσο σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης, το EGFR και το VEGF δεν φαίνεται να αποτελούν αξιόπιστους προγνωστικούς δείκτες στα καρκινώματα του παχέος εντέρου.

SUMMARY

Background: Colorectal carcinomas account for about 10% of deaths in the world, especially in developed countries. The aim of this study was to investigate the EGFR and VEGF expression in colorectal carcinoma and to correlate them with the available clinicopathological parameters.

Methods: Immunohistochemical staining for EGFR and VEGF was carried out on paraffin embedded tissue sections of 4 µm thick from specimens of 90 patients who underwent surgery for colorectal cancer.

Data about sex, age, size and location of the tumor, grade, necrosis, depth of invasion, inflammatory response, vascular invasion and status of lymph nodes were obtained from all patients.

The staining degree was evaluated as in the following: weak moderate and strong. VEGF and EGFR expression was classified in two groups corresponding to the percentage of positive carcinoma cells: low ($\leq 25\%$) and high ($>25\%$).

Results: Tumor cells showed positive staining for EGFR in 42 cases (47%) and for VEGF in 81 cases (90%). The degree of staining with EGFR antibody was moderate to strong in the cell's membrane. The degree of staining with VEGF antibody was moderate to strong and observed mainly in the cytoplasm. All the cases of the VEGF positive group had high expression ($>25\%$) while the EGFR positive group had high expression ($>25\%$) in 9 cases and low expression ($<25\%$) in 33 cases. There wasn't any relationship between the expression of EGFR and VEGF and all of the above parameters ($p > 0.05$).

Conclusion: This study suggests that EGFR and VEGF appear not to be reliable prognostic factors in colorectal carcinomas.

Key words: EGFR, VEGF, colorectal carcinoma, immunohistochemistry.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Meteoglu I, Meydan N, Erkuw M. Id-1: regulator of EGFR and VEGF and potential target for colorectal cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008 Nov 12;27:69
2. Zheng S, Han MY, Xiao ZX et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2003 Jun;9(6): 1227-30.
3. Uberal I, Kolar Z, Trojanec R. et al. The status and role of ErbB receptors in human cancer. *Exp Mol Pathol.* 2008 Apr;84(2):79-89. Epub 2008 Jan 5.
4. McKay JA, Murray LJ, Curran S et al. Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases. *Eur J Cancer.* 2002 Nov; 38(17):2258-64.
5. Kopp R, Rothbauer E, Mueller E et al. Reduced survival of rectal cancer patients with increased tumor epidermal growth factor receptor levels. *Dis Colon Rectum.* 2003 Oct;46(10):1391-9.
6. Kopp R, Rothbauer E, Ruge M et al. Clinical implications of the EGFR receptor/ligand system for tumor progression and survival in gastrointestinal carcinomas: evidence for new therapeutic options. *Reent Results Cancer Res.* 2003;162:115-32.
7. Zhang X, Ling MT, Feng H et al. Id-1 stimulates cell proliferation through activation of EGFR in ovarian cancer cells. *Br J Cancer.* 2004 Dec 13;91(12): 2042-7.
8. Ling MT, Wng X, Lee DT et al. Id-1 expression induces androgen independent prostate cancer cell growth through activation of epidermal growth factor receptor (EGFR). *Cacinogenesis* 2004 Apr; 25(4):517-25. Epub 2003 Dec 19.
9. Abdou AG, Aiad H, Asaad N et al. Immunohistochemical evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) IN COLORECTAL CARCINOMA. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2006 Dec; 18(4):311-22.
10. Bendardaf R, Buhmeida A, Hilska M et al. VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization, stage and long-term disease-specific survival. *Anticancer Res.* 2008 Nov-Dec; 28(6B): 3865-70.
11. George ML, Tutton MG, Janssen F et al. VEGF-A, VEGF-C and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia.* 2001 Sep-Oct; 3(5):420-7.
12. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancers: a target for novel prognostic and therapeutic approaches. *Ann Surg.* 2003 Jul; 238(1):9-28.
13. Zafirellis K, Agrogiannis G, Zachaki A et al. Prognostic significance of VEGF expression evaluated by quantitative immunohistochemical analysis in colorectal cancer. *J Surg Res.* 2008 Jun 1; 147(1):99-107.
14. Lee TK, Poon RT, Yuen AP et al. Regulation of angiogenesis by Id-1 through hypoxia inducible factor-1alpha-mediated vascular endothelial growth factor up-regulation in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006 Dec 1;12(23): 6910-9.
15. Ling MT, Lau TC, Zhou C et al. Overexpression of Id-1 in prostate cancer cells promotes angiogenesis through the activation of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Carcinogenesis.* 2005 Oct;26(10):1668-76
16. Obermair A, Khlberger P, Bancher-Todesca D et al. Influence of microvessel density and vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression on prognosis in vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 1996 Nov; 63(2):204-9.
17. Inoue K, Slaton JW, Karashima T et al. The prognostic value of angiogenesis factor expression for predicting recurrence and metastasis of bladder cancer after neoadjuvant chemotherapy and radical cystectomy. *Clin Cancer Res.* 2000 Dec; 6(12):4866-73.
18. Shen GH, Ghazizadeh M, Kawanami O et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian carcinoma. *Br J Cancer.* 2000 Jul; 83(2):196-203.
19. Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. *Ann Surg Oncol.* 2006 Jun; 13(6):823-35. Epub 2006 April 18.