

Ιστικές μικροσυστοιχίες στην ανοσοϊστοχημική και μοριακή διερεύνηση του συστήματος DNA MMR στον καρκίνο του παχέος εντέρου

ΣΚΟΠΟΣ Η εφαρμογή των ιστικών μικροσυστοιχιών και της υπολογιστικής μορφομετρίας στη συνδυασμένη διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών MLH1, MSH2 και MSH6 του συστήματος επιδιόρθωσης σφαλμάτων του DNA (DNA mismatch repair system) και της αστάθειας των χρωμοσωμάτων 2, 3, 9, 16 και 17 σε σποραδικά αδενοκαρκινώματα του παχέος εντέρου. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση των μορίων MLH1, MSH2, MSH6 με σύστημα αυτόματης ανοσοϊστοχημείας τόσο σε βιοπτικό όσο και σε κυτταρολογικό (ενδοχειρουργικά αποτυπώματα) υλικό προερχόμενο από 60 αδενοκαρκινώματα παχέος εντέρου (4 υψηλής, 40 μέσης και 16 χαμηλής διαφοροποίησης). Εφαρμόστηκε, παράλληλα, η μοριακή τεχνική του χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού με τη χρήση των ιχνηθετών των χρωμοσωμάτων 2, 3, 9, 16 και 17. Το σύνολο των περιπτώσεων συμπεριελήφθη σε έναν κύβο παραφίνης με την εφαρμογή της μεθόδου των ιστικών μικροσυστοιχιών (tissue microarrays). Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης του MLH1 πραγματοποιήθηκε με σύστημα ανάληψης εικόνας, με το οποίο υπολογίστηκε η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, όπως και η μέτρηση των σημάτων των κεντρομερών ανά πυρήνα, ενώ η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του λογισμικού στατιστικής SPSS version 11.0-δοκιμασίες independent samples T και chi square. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Απώλεια της έκφρασης ή υποέκφραση των MLH1, MSH2 και MSH6 παρατηρήθηκε σε 8 περιστατικά (13%). Υπερίσχυσε η απώλεια της έκφρασης του MLH1 (7/8). Σε 1/8 περιστατικά παρουσιάστηκε συνδυασμένη υποέκφραση ή απώλεια έκφρασης και των 3 δεικτών, σε 4/8 όγκους δύο δεικτών, ενώ στα υπόλοιπα 3 παρατηρήθηκε μοναδιαία απώλεια έκφρασης δεικτών. Στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0,01$) παρατηρήθηκαν στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων κανονικής έκφρασης (52 όγκοι) και υποέκφρασης (8 όγκοι) με βάση την έκφραση του MLH1 και την αστάθεια ή τη σταθερότητα των χρωμοσωμάτων 2, 9 και 17. Ανευπλοειδία (2,5 [οριακή]-5 σήματα/ανά πυρήνα) παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό στην πρώτη ομάδα, εύρημα το οποίο συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση, ειδικά όσον αφορά στην αστάθεια του χρωμοσώματος 17. Τέλος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,01$) στην εντόπιση των όγκων, καθώς 6/8 εξορμώνταν από το δεξιό κόλον. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η λειτουργική έκπτωση του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA οδηγεί στο φαινόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας. Η ανοσοϊστοχημική απώλεια ή η υποέκφραση του γονιδίου *MLH1* στην πλειοψηφία των όγκων αυτών υποδηλώνει τον κριτικό ρόλο του στην απενεργοποίηση του συστήματος. Οι όγκοι αυτοί, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μέση προς χαμηλή διαφοροποίηση, στην πλειονότητά τους εμφανίζονται χρωμοσωματικά σταθεροί όσον αφορά στα εξεταζόμενα χρωμοσώματα, ενώ, με εξαίρεση το χρωμόσωμα 3, η ανευπλοειδία φαίνεται να πλήττει σε μεγαλύτερο βαθμό τους ανοσοϊστοχημικά σταθερούς όγκους.

Ε. Τσιάμπας,¹
Λ. Μαναίος,²
Α. Μελά,³
Α. Σταματελόπουλος,⁴
Α. Εμμανουηλίδου,³
Α. Καραμέρης¹

¹Παθολογοανατομικό Τμήμα,
Εργαστήριο Μορφομετρίας,
417 ΝΙΜΤΣ, Αθήνα

²Α' Χειρουργική Κλινική, 417 ΝΙΜΤΣ,
Αθήνα

³Τμήμα Κλινικής Κυτταρολογίας, 417
ΝΙΜΤΣ, Αθήνα

⁴Εργαστήριο Πειραματικής
Χειρουργικής, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Tissue microarrays in immunohistochemical expression and molecular detection of DNA MMR system instability in colorectal cancer

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Ιστικές μικροσυστοιχίες
Καρκίνος παχέος εντέρου
Μικροδορυφορική αστάθεια

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου αποτελεί προϊόν της συνδυασμένης και αλληλοδιάδοξης επίδρασης γενετικών συμβάντων, τα οποία μετατρέπουν το φυσιολογικό βλεννογόνο αρχικά σε δυσπλαστικό (aberrant crypt foci, πρόδρομες εστιακές δυσπλαστικές κρύπτες), στη συνέχεια σε νεοπλασματικό (αδενωματώδης εξέλιξη) και κατόπιν, με την πάροδο του χρόνου, σε καρκινικό (καρκινική εξαλλαγή). Τα πρότυπα ανάπτυξης του εν λόγω καρκίνου επιτρέπουν την ταξινόμηση των περιστατικών σε εκείνα που ανήκουν στην κατηγορία του κληρονομικού καρκίνου χωρίς πολυποδίαση (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPC), σε εκείνα που εμφανίζουν οικογενή πολυποδίαση (familial adenomatous polyposis, κληρονομούμενες μεταλλάξεις του γονιδίου *APC*) και στις σποραδικές μορφές εκδήλωσης (sporadic cancer), όπου το υπόστρωμα εξόρμησης του όγκου ως αποτέλεσμα συσσώρευσης γενετικών σφαλμάτων τελεί υπό διερεύνηση.¹

Το σύνδρομο Lynch ή HNPC αποτελεί μια γενετικά μεταβιβαζόμενη με τον επικρατούντα αυτοσωμικό χαρακτηριστήρα διαταραχή και σχετίζεται με την ανάπτυξη καρκινώματος του παχέος εντέρου, ενδομητρικού καρκινώματος, καρκίνου του λεπτού εντέρου, του ουρητήρα ή της νεφρικής πυέλου σπανιότερα. Η καρκινογενετική διαδικασία συσχετίζεται με μεταλλάξεις (germline mutations) σε 5 γονιδιακούς επιτόπους υπεύθυνους για την επανορθωτική λειτουργία του DNA σε περιπτώσεις αστοχίας συνταιριάσματος των βάσεων (DNA mismatch repair function).² Το σύστημα αυτό αποτελεί ένα «γενετικό απολίθωμα» του οργανισμού, όπως και οι ταχέως επαναλαμβανόμενες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (συνήθως αποτελούμενες από 2–6 ζεύγη βάσεων) που συγκροτούν το μικροδορυφορικό DNA (microsatellite DNA) και τα κυριότερα γονίδια εδράζονται στους βραχείς βραχίονες των χρωμοσωμάτων 2 (*MSH2-2p21*, *MSH6-2p22*) και 3 (*MLH1-3p31*). Τα παραγόμενα από τα γονίδια αυτά πρωτεϊνικά προϊόντα ελέγχουν τυχόν λάθη αναδυόμενα κατά τη διαδικασία αντιγραφής του DNA. Το τελευταίο αποτελεί ένα ευαίσθητο, εύθραυστο βιολογικό μόριο. Κάθε κύτταρο υπολογίζεται ότι στερείται 10.000 βάσεων ανά ημέρα από τον κατακερματισμό του μορίου λόγω της θερμοκρασίας του σώματος ή λόγω μηχανικών επιβαρύνσεων και τα διαιρούμενα κύτταρα εισάγουν επιπρόσθετα λάθη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του. Δύο διαφορετικά ετεροδιμερή συμπλέγματα, προσομοιάζοντα στο σύστημα MutS των βακτηρίων, είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση των λαθών: *MSH2-MSH3* και *MSH2-MSH6*. Και ενώ η παρουσία του *MSH2* στο σύμπλεγμα είναι επιβεβλημένη, το *MSH3* μπορεί να αντικαταστήσει το *MSH6* στη διορθωτική διαδικασία της

εισαγωγής λαθών, αλλά όχι των μονοβασικών ελλειπτικών ζευγαριών (single-base mispairs). Την αναγνώριση των λαθών ακολουθεί η δράση του συμπλέγματος των ετεροδιμερών *MLH1-MLH2*, τα οποία προσομοιάζουν στο σύστημα MutL των βακτηρίων και επιτελούν την κύρια επιδιορθωτική διαδικασία της ανασυγκρότησης και του συνταιριάσματος των βάσεων. Έλλειψη της επιδιορθωτικής αυτής ικανότητας του μορίου του DNA λόγω μετάλλαξης προκαλεί την εκδήλωση της μικροδορυφορικής αστάθειας. Μια ομάδα γενετικών επιτόπων (loci-αλληλουχίες μικροδορυφορικού DNA) που περιλαμβάνει τα *BAT25*, *BAT26*, *BAT40*, *D2S123*, *D5S346*, *D17S250* συνιστάται ως δείκτης για τις μελέτες μοριακής βιολογίας (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR).³ Η ανεύρεση μεταλλάξεων σε δύο τουλάχιστον αλληλουχίες ταυτόχρονα είναι δηλωτική ανάπτυξης υψηλού βαθμού μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-high). Η παθολογική εμφάνιση μόνο ενός των προηγούμενων μικροδορυφορικών αλληλουχιών συνιστά χαμηλού βαθμού μικροδορυφορική αστάθεια (MSI-low), ενώ καμιά μεταβολή δηλωτική αστάθειας στους δείκτες λογίζεται ως μικροδορυφορική σταθερότητα (MSS).

Οι μελέτες καταδεικνύουν ότι σε 60% των περιπτώσεων HNPC και 15–20% των περιστατικών σποραδικής εμφάνισης καρκίνου παχέος εντέρου παρατηρείται το φαινόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας.⁴ Ο κύριος μηχανισμός μοριακής απορρύθμισης περιλαμβάνει απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) και σημειακή μετάλλαξη του εναπομεινάντος αλληλίου ή ομόζυγη απάλειψή τους, ενώ παρατηρείται και υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου.⁵ Η σημαντική κλινική παρατήρηση όμως αφορά στην πρόγνωση των ασθενών που εμφανίζουν τη νόσο, καθώς μεγάλες σειρές κλινικών μελετών διαπίστωσαν εκλεκτικότητα στην ανατομική εντόπιση (δεξιό κόλον), επέκταση του προσδόκιμου επιβίωσης και καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (5FU).⁶

Πρωταρχικό σκοπό της έρευνας αποτέλεσε η ευαισθητοποίηση των ογκολόγων στη διαχείριση των ασθενών που πληρούν τα μοριακά κριτήρια της έκπτωσης του συστήματος DNA MMR, καθώς οι τελευταίοι χαρακτηρίζονται από επέκταση του προσδόκιμου επιβίωσης και ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία. Η παρούσα μελέτη, η οποία αποτελεί μια από τις πρώτες αυτού του είδους στον ελληνικό χώρο με την εφαρμογή τεχνολογίας αιχμής, όπως των ιστικών μικροσυστοιχιών (tissue microarrays) και υπολογιστικής μορφομετρίας –computerized image analysis– (πυκνομετρική μελέτη, optical density) στη συνδυασμένη διερεύνηση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης και μοριακής αστάθειας (χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού, CISH), έθεσε ως διττό στόχο την ποσο-

τική εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των αναφερόμενων πρωτεϊνών σε σχέση με την αστάθεια των χρωμοσωμάτων 2, 3, 9, 16 και 17.

Το χρωμόσωμα 17 επιλέχθηκε να πλαισιώσει τη μοριακή μελέτη, καθώς φιλοξενεί στους βραχιόνες του πλήθος κομβικών γονιδίων, όπως *Trp53*, *topoisomerase IIa*, *HER2/NEU*, *BRCA1*, των οποίων η αστάθεια συντελεί στην καρκινογενετική διαδικασία. Επίσης, το χρωμόσωμα 16 επιλέχθηκε λόγω της εντόπισης σε αυτό (γονιδιακή θέση: 16q22) του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη E-καντχερίνη (*e-cadherin*). Τα μέλη της οικογένειας των καντχερινών (*E-N-P cadherin*) αποτελούν διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες που επάγουν την ασβεστο-εξαρτώμενη διακυτταρική προσκόλληση, συντελώντας –μέσω της σύνδεσης με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες της οικογένειας των κατενινών (α , β , γ)– στη σταθερότητα των νηματίων της ακτίνης και κατ' επέκταση στη στιβαρότητα του κυτταροσκελετού, ενώ παράλληλα, με τη μεσολάβση της β -κατενίνης, ρυθμίζεται η μεταγωγή σημάτων προς τον πυρήνα. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η απορρύθμιση των πρωτεϊνών συνεπάγεται την απελευθέρωση του διηθητικού και μεταστατικού δυναμικού του όγκου. Στο χρωμόσωμα 9, τέλος, εδράζεται το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p16* (9p21-22), το οποίο αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου και μαζί με τα *DCC* (18q), *APC* (5q) και *p53* (17p) φαίνεται να αποτελεί στόχο πρώιμης απορρύθμισης στον εν λόγω καρκίνο. Ως μοριακός δείκτης χρωμοσωμιακής αστάθειας επιλέχθηκαν οι αλληλουχίες του α-δορυφορικού DNA (α -satellite DNA), που συγκροτούν τα κεντρομερή.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Το υλικό αναδύθηκε από την αρχαιακή ιστική βάση του Παθολογοανατομικού Τμήματος του 417 ΝΙΜΤΣ και αφορούσε σε κύβους παραφίνης 60 σποραδικών πρωτοπαθών αδενο-

καρκινωμάτων παχέος εντέρου, προϊόντων δεξιάς (17) και αριστερής (43) τοπικής ή εκτεταμένης κολεκτομής, από τα οποία 4 υψηλής διαφοροποίησης, 40 μέσης και 16 χαμηλής και βαθμονομημένων σύμφωνα με το σύστημα σταδιοποίησης ASTLER-COLLER σε 33 B1-B2 και 27 C1-C2. Αφορούσαν σε 32 άρρενες ασθενείς μέσης ηλικίας 75,4 και 28 θήλεις μέσης ηλικίας 77,2 ετών.

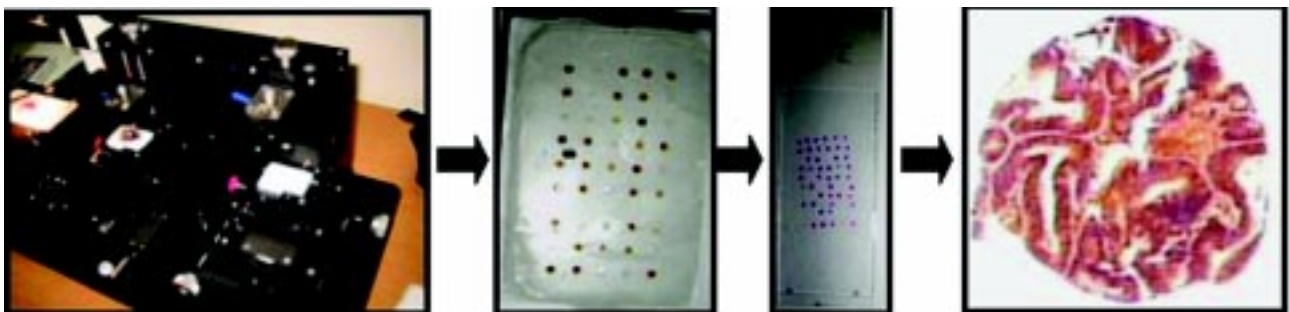
Κατασκευή ιστικών μικροσυστοιχιών (tissue microarrays)

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 έναν 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. Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα TMArrayer 100 της εταιρείας Chemicon (εικ. 1) και συγκροτήθηκε ένας κύβος παραφίνης, με ενσωματωμένο το σύνολο των 60 όγκων σε παραλληλογραμμική διάταξη 6 ιστικών κυλίνδρων διαμέτρου 1 mm ανά σειρά (10 σειρές). Επακολούθησε μικροτόμηση σε τομές πάχους 2-3 μ m προορισμένες για χρώση πωσίνης-αιματοξυλίνης και ανοσοϊστοχημεία, καθώς και των 4-5 μ m για μοριακή μελέτη. Παράλληλα, το πρωτόκολλο της ανοσοϊστοχημείας εφαρμόστηκε τροποποιημένο και σε σποραδικά ενδοχειρουργικά επιχρίσματα (imprints).

Κατά τη μικροτόμηση και λόγω της άνισης εγκλεισμένης σε βάθος ποσότητας των ιστών των διαφορετικών περιστατικών συμβαίνει σε ένα μικρό ποσοστό απώλεια υλικού, που μεταφράζεται ως έλλειψη της αντίστοιχης κυκλικής επιφάνειας (spot) στο πλακίδιο. Όπου συνέβη αυτό, πραγματοποιήθηκε η αντίστοιχη μελέτη σε συμβατικό πλακίδιο.

Ανοσοϊστοχημική διερεύνηση

Επιλέχθηκαν τα πολυκλωνικά αντισώματα (rabbit polyclonal) anti-MLH1 (N20-Santa Cruz) και anti-MSH6/GTBP (H 141-Santa Cruz), καθώς και το μονοκλωνικό (mouse monoclonal)



Εικόνα 1. Κατασκευή ιστικών μικροσυστοιχιών: Από τον κύβο παραφίνης στο πλακίδιο (χρώση πωσίνης-αιματοξυλίνης).

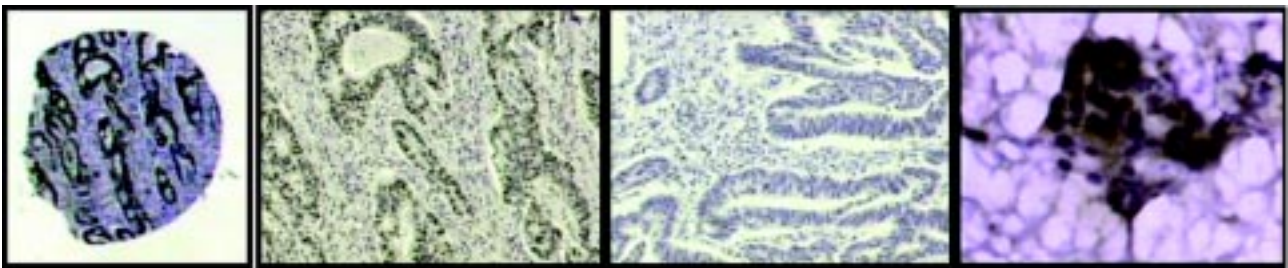
anti-MSH2 (2MSH01-neomarkers/Lab vision) και σε αραιώσεις 1:200, 1:50 και 1:80, αντίστοιχα. Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικής μεθόδου των δύο σταδίων (en vision-two step method). Σύμφωνα με την τεχνική και αφού προηγηθεί αποπαραφίνωση των ήδη θερμοανθετισών τομών στον κλίβανο σε 37 °C, η επώασή τους πραγματοποιείται με τις ανοσοσφαιρίνες να δεσμεύονται σε ένα πολυμερές δεξτράνης σημασμένο με την υπεροξειδάση για χρονικό διάστημα 30–40 min και οπτικοποιείται το αποτέλεσμα της σύνδεσης ενσταλλάσσοντας στις τομές ως χρωμογόνο 3,3-τετραϋδροχλωρική διαμινοβενζιδίνη (DAB) για χρονικό διάστημα 5 min. Η όλη διαδικασία, η οποία βασίζεται στην παράκαμψη της δέσμωσης με τη βιοτίνη αποδίδοντας καθαρότερο υπόστρωμα, πραγματοποιήθηκε με το αυτόματο μηχανήμα ανοσοϊστοχημείας I 6000 της εταιρείας Biogenex. Ως αποδεκτή κρίθηκε η πυρηνική χρώση (εικ. 2).

Μοριακή διερεύνηση

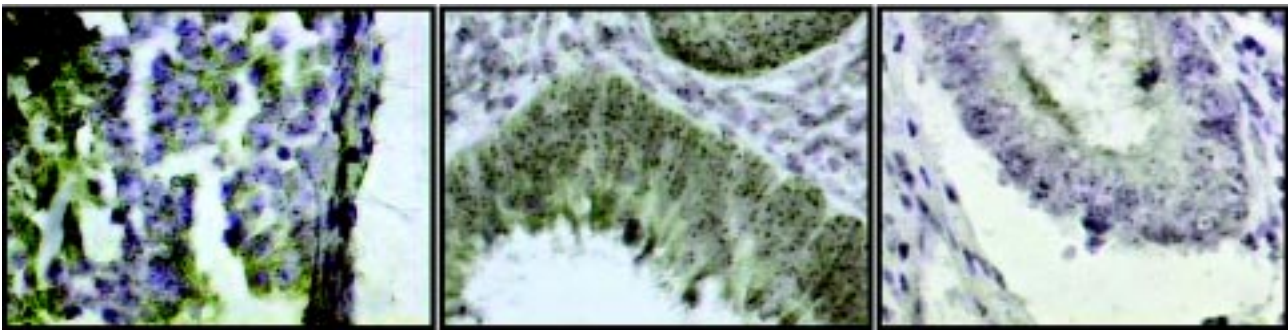
Η μελέτη της αστάθειας των χρωμοσωμάτων 2, 3, 9, 16 και 17 πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (chromogenic *in situ* hybridization, CISH). Η μοριακή αυτή τεχνική αποτελεί μια παραλλαγή του κλασικού υβριδισμού, εκμεταλλευόμενη μια τύπου ανοσοϊστοχημείας διαδικασία και παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης της αριθμητικής χρωμοσωματικής ή ειδικής γονιδιακής κατάστασης, εντάσσοντας τα σήματα των δομών τους στο κυτταρικό (πυρηνικό)

περιβάλλον. Σε αντίθεση με τον FISH, προσφέρει τη δυνατότητα αυτής της συνεκτίμησης σε μεγέθυνση ακόμη και $\times 40$ σε συμβατικά μικροσκόπια και τα παραγόμενα πλακίδια αποθηκεύονται όπως τα ανοσοϊστοχημικά χρωσθέντα. Χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο CISH της εταιρείας Zymed, καθώς και οι κεντρομερείς μήλεις των χρωμοσωμάτων 2, 3, 9, 16 και 17 (biotin labeled centromeric probes-Zymed kit/Cambeo). Τα πλακίδια τοποθετούνταν στον κλίβανο και στους 37 °C, ενώ για 2–4 ώρες η θερμοκρασία ανερχόταν στους 60 °C. Την αποπαραφίνωση και προθέρμανση των τομών με επίθεση του ενζύμου πεψίνη διαδεχόταν η αφυδάτωση (προοδευτικά ανιούσα σειρά αλκοολών), η αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA και στη συνέχεια ο υβριδισμός σύμφωνα με την αξιωματική αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Η επώαση αυτή πραγματοποιείται στους 37 °C και για χρονικό διάστημα 12–48 ωρών (overnight). Την ενσωμάτωση αυτή των βιοτυλιωμένων κεντρομερών ικνηθετών (probes) ακολούθησε έκπλυση και σύνδεση με το σύμπλοκο υπεροξειδάσης-στρεπταβιδίνης (HRP) και στη συνέχεια η σύνδεση σημειούνταν 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 ανιχνεύονταν ως πυκνοχρωματικές στίξεις (dots) στο περιβάλλον του πυρήνα (εικ. 3) και η αποτίμησή τους πραγματοποιείται σύμφωνα με τον πίνακα αξιολόγησης (πίν. 1).

Με δεδομένη την τυχαίοποιημένη και ανομοιομόρφη πυρηνική διαστρωμάτωση στο εγκλεισμένο σε κύβους παραφίνης



Εικόνα 2. Ιστικός κύλινδρος διαμέτρου 1 mm ($\times 2,5$). Έκφραση και απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 ($\times 10$). Ενδοχειρουργικό αποτύπωμα (imprint) εμφανίζουν την πυρηνική ανοσοκυτταροχημική χρώση ($\times 20$).



Εικόνα 3. Ανάδειξη των κεντρομερών των χρωμοσωμάτων 3 (αριστερά), 16 (κέντρο) και 17 (δεξιά) με CISH ($\times 40$). Ανευπλοειδία του χρωμοσώματος 16, φυσιολογικό διπλοειδικό το χρωμόσωμα 3, ενώ κάποιοι υποπληθυσμοί στο χρωμόσωμα 17 παρουσιάζουν επίσης ανευπλοειδία.

Πίνακας 1. Αξιολόγηση σημάτων κεντρομερών χρωματοσωμάτων.

Σήματα ανά πυρήνια	Αξιολόγηση σημάτων κεντρομερών
1	Μονοσωμία
2	Φυσιολογικό
3-5	Ανευπλοειδία

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

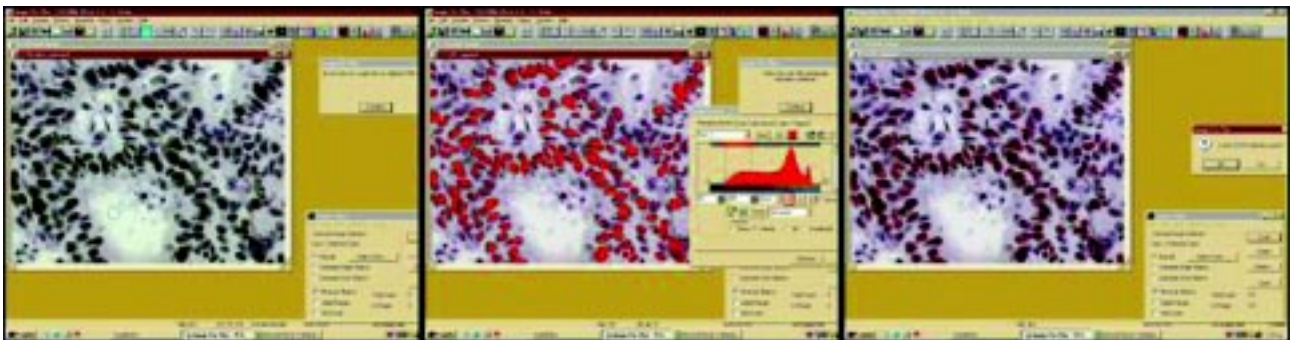
βιοπτικό υλικό, ο εξεταζόμενος κυτταρικός υποπληθυσμός χαρακτηρίζεται στατιστικά από την προεξάρχουσα χρωμοσωμιακή κατάσταση (αστάθεια ή σταθερότητα) του δείγματος (π.χ. μονοσωμία σε >50% των εξεταζόμενων πυρήνων). Η διαπίστωση συνύπαρξης διαφορετικών κυτταρικών υποπληθυσμών με ανευπλοειδία ή χρωμοσωμιακή σταθερότητα μπορεί να ερμηνευθεί μέσω της ετερογένειας, την οποία εμφανίζουν οι καρκινικοί όγκοι, καθώς αναδύονται κλώνοι με ενσωμάτωση νέων γενετικών συμβάντων (χρωμοσωμιακές ή ειδικές γονιδιακές αστάθειες) που χαρακτηρίζονται από επιθετικότερη βιολογική συμπεριφορά.

Υπολογιστική μορφομετρική μελέτη (image analysis)

Η ποσοτική μέτρηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης MLH1 πραγματοποιήθηκε στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του 417 ΝΙΜΤΣ με ημιαυτόματο σύστημα ανάλυσης εικόνας DIS (image analysis system: Intel Pentium IV/

Camera Microwave Systems (640x480), Matrox II Framegrabber, μικροσκόπιο Olympus BX-50-λογισμικό: Windows 98/Image Pro Plus version 3.0-Media Cybernetics 1997. Σε κάθε ανοσοϊστοχημική τομή επιλέχθηκαν 5 αντιπροσωπευτικά πεδία υπό μεγέθυνση x40 και μετρήθηκε και αξιολογήθηκε, τελικά, στατιστικά η ένταση της ειδικής πυρηνικής προσροφηθείσας χρώσης του MLH1, 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 οπτικής πυκνότητας εκτείνεται σε ένα φάσμα 256 συνεχόμενων τιμών (0-255), όπου το 0 αντιπροσωπεύει το απόλυτο μαύρο και το 255 το απόλυτο λευκό στο γκρι 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) έκτασης 16848 μm², δηλαδή το 25% περίπου του οπτικού πεδίου του μικροσκοπίου στη μεγέθυνση x40 (εικ. 4).

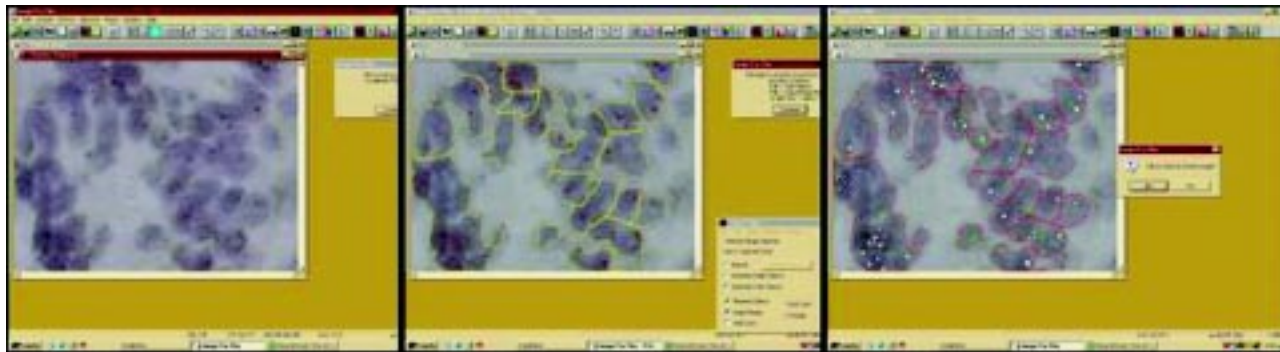
Με αντίστοιχο τρόπο και τροποποιημένη μακροεντολή πραγματοποιήθηκε και η ποσοτική εκτίμηση του χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού, κατά την οποία υπολογίστηκε ο αριθμός των μεμονωμένων σημάτων (centromeric signals) των υπό εξέταση χρωμοσωμάτων σε 5 οπτικά πεδία και σε μεγέθυνση x100 (εικ. 5).



Εικόνα 4. Στάδια υπολογιστικής ανάλυσης εικόνας για εκτίμηση οπτικής πυκνότητας ανοσοχρώσης της MLH1.



Εικόνα 5. Στάδια υπολογιστικής ανάλυσης εικόνας για εκτίμηση χρωμοσωμιακής αστάθειας.



Εικόνα 5. Στάδια υπολογιστικής ανάλυσης εικόνας για εκτίμηση χρωμοσωμικής αστάθειας.

Έμφαση αποδόθηκε στην επιλογή των πεδίων που παρουσίαζαν χρωμοσωμική αστάθεια. Κάθε περιστατικό, κατά την ολοκλήρωση της μέτρησης των παραμέτρων έντασης ή αριθμού σημάτων ανά πυρήνια, αρχειοθετείτο σε λογιστικό φύλλο (excel sheet).

Πρέπει να σημειωθεί ότι, λόγω της ημιαυτόματης διαχείρισης των ψηφιακών εικόνων, επιτρέπεται στο χειριστή-ιατρό να επεμβαίνει αποκόποντας ή ενσωματώνοντας χώρους, οι οποίοι έχουν διαφύγει της εποπτείας του προγράμματος λόγω της ποιότητας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης ή λόγω αδυναμίας διαχωρισμού (splitting) των αντικειμένων (επικαλυπτόμενα κύτταρα), αυξάνοντας την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου.

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του λογισμικού προγράμματος SPSS version 11.0. Η σύγκριση των μέσων τιμών της μεταβλητής της οπτικής πυκνότητας πραγματοποιήθηκε με τις δοκιμασίες independent sample t, ενώ με τη δοκιμασία chi square πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση με τους χαρακτήρες του ιστολογικού τύπου (διαφοροποίηση-σταδιοποίηση-εντόπιση), καθώς και

με την κατάσταση σταθερότητας ή αστάθειας των χρωμοσωμάτων (διπλοειδικότητα ή ανευπλοειδία). Ως στατιστικά σημαντικές κρίθηκαν συσχετίσεις που εμφάνιζαν τιμή $P < 0,05$. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 2 [μέση τιμή έντασης ανοσοϊστοχημικής χρώσης (MLH1 STAIN INT) και μέση τιμή σημάτων κεντρομερών ανά πυρήνια (Chr 2, 3, 9, 16, 17)].

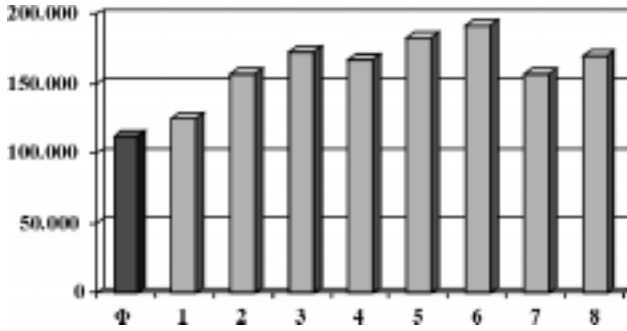
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ομάδα των 60 σποραδικών αδενοκαρκινωμάτων του παχέος εντέρου εμφάνισε συνολικά απώλεια της έκφρασης των MLH1, MSH2 και MSH6 σε 8 περιστατικά (13%). Υπερίσχυσε η απώλεια της έκφρασης του MLH1 (7/8), σε 1/8 περιστατικά παρουσιάστηκε συνδυασμένη υποέκφραση ή απώλεια έκφρασης και των 3 δεικτών, σε 4/8 όγκους δύο δεικτών, ενώ στα υπόλοιπα 3 παρατηρήθηκε μοναδιαία απώλεια δεικτών. Η μέση τιμή της οπτικής πυκνότητας του MLH1 παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά στις συγκρίσεις των ομάδων έκφρασης και υποέκφρασης ($P < 0,001$) των όγκων, ενώ δεν συσχετίστηκε με το βαθμό διαφοροποίησης ($P < 0,918 - P < 0,09$) (εικ. 6).

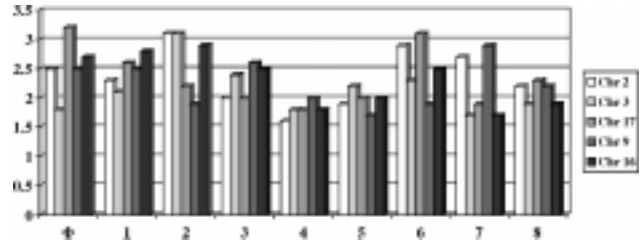
Πίνακας 2. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικής και μοριακής μελέτης.

α/α	Φύλο, ηλικία	Διαφοροποίηση	Εντόπιση	Στάδιο A C	MLH1 STAIN INT	Chr 2	Chr 3	Chr 9	Chr 16	Chr17
1	A 70	Χαμηλή	Ανιόν	B2	125,287	2,3	2,1	2,5	2,8	2,6
2	A 78	Χαμηλή	Ανιόν	C2	157,229	3,8	3,1	1,9	2,7	2,2
3	Θ 80	Χαμηλή	Τυφλό	B1	172,992	2,0	2,4	2,6	2,5	2,0
4	A 75	Μέση	Εγκάρσιο	B2	167,198	1,6	1,8	2,0	1,8	1,8
5	Θ 74	Μέση	Σιγμοειδές	B1	183,992	1,9	2,2	1,7	2,0	2,0
6	A 91	Μέση	Εγκάρσιο	B2	192,446	2,9	2,3	1,9	2,5	3,1
7	Θ 62	Μέση	Σιγμοειδές	C2	156,782	3,2	1,7	2,9	1,7	1,9
8	Θ 61	Μέση	Ανιόν	C1	169,772	2,2	1,9	2,2	1,9	2,3
Σταθεροί (52)					112,390	2,5	1,8	2,5	2,7	3,2

MLH1 STAIN INT: Μέση τιμή έντασης ανοσοϊστοχημικής χρώσης, Chr: Χρωμόσωμα



Εικόνα 6. Ραβδογραμμική αναπαράσταση της συσχέτισης των περιστατικών (1-8) και της ομάδας των φυσιολογικών όσον αφορά στην ανοσοέκφραση όγκων (Φ) με την οπτική πυκνότητα της χρώσης.

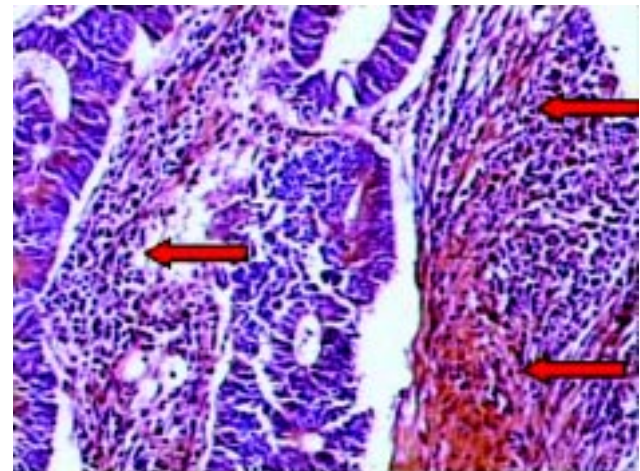


Εικόνα 7. Ραβδογραμμική αναπαράσταση της συσχέτισης των περιστατικών (1-8) και της ομάδας των φυσιολογικών όσον αφορά στην ανοσοέκφραση όγκων (Φ) με την κατάσταση των χρωμοσωμάτων (Chr) 2, 3, 9, 16 και 17.

Η μοριακή ανάλυση κατέδειξε:

- Χρωμοσωματική σταθερότητα για το *χρωμόσωμα 2* σε 5/8 όγκους και ανευπλοειδία για τους υπόλοιπους, ενώ στην ομάδα των σταθερών ανοσοϊστοχημικά οριακή ανευπλοειδία
- Χρωμοσωματική σταθερότητα για το *χρωμόσωμα 3* σε 6/8 όγκους και ανευπλοειδία για τους υπόλοιπους, ενώ στην ομάδα των σταθερών επίσης υπερίσχυσε η σταθερότητα (διπλοειδία)
- Χρωμοσωματική σταθερότητα για το *χρωμόσωμα 9* σε 5/8 όγκους και ανευπλοειδία για τους υπόλοιπους, ενώ στην ομάδα των σταθερών οριακή ανευπλοειδία
- Χρωμοσωματική σταθερότητα για το *χρωμόσωμα 16* σε 4/8 όγκους και ανευπλοειδία για τους υπόλοιπους, ενώ στην ομάδα των σταθερών ανευπλοειδία
- Χρωμοσωματική σταθερότητα για το *χρωμόσωμα 17* σε 6/8 όγκους και ανευπλοειδία για τους υπόλοιπους, ενώ στην ομάδα των σταθερών ανευπλοειδία.

Στατιστικά σημαντικές διαφορές, όμως ($P < 0,01$), παρατηρήθηκαν στη σύγκριση μεταξύ των ομάδων κανονικής έκφρασης (52 όγκοι) και υποέκφρασης (8 όγκοι) με βάση την έκφραση του *MLH1* και την αστάθεια ή τη σταθερότητα των χρωμοσωμάτων 2, 9 και 17. Ανευπλοειδία (2,5 [οριακή] - 5 σήματα ανά πυρήνα) παρατηρήθηκε σε μεγαλύτερο βαθμό στην πρώτη ομάδα, εύρημα το οποίο συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση, ειδικά όσον αφορά στην αστάθεια του χρωμοσώματος 17 (εικ. 7). Τέλος, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,01$) στην εντόπιση των όγκων, καθώς 6/8 εξορμούνταν από το δεξιό κόλον, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη συσχέτιση με το φύλο. Σημαντικό παράμετρο αποτελεί όμως και το γεγονός ότι όγκοι με έλλειψη έκφρασης σε τουλάχιστον 2 από τα εξεταζόμενα αντισώματα εμφάνισαν χαρακτηριστική λεμφοκυτταρική αντίδραση (εικ. 8).



Εικόνα 8. Λεμφοκυτταρική διήθηση του όγκου (μέσης διαφοροποίησης αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου με υποέκφραση *MLH1* και *MSH2*).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η λειτουργική έκπτωση του συστήματος επιδιόρθωσης του DNA (DNA mismatch repair system) οδηγεί στο φαινόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας.⁷ Η ανοσοϊστοχημική απώλεια ή η υποέκφραση σε ποσοστό 13% συσχετίζεται περισσότερο με την ανοσοϊστοχημική υποέκφραση του γονιδίου *MLH1* (~85%) στους όγκους αυτούς, γεγονός που υποδηλώνει τον κριτικό ρόλο του στην απενεργοποίηση του συστήματος. Οι όγκοι αυτοί, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μέση προς χαμηλή διαφοροποίηση, στην πλειονότητά τους εμφανίζονται χρωμοσωματικά σταθεροί όσον αφορά στα εξεταζόμενα χρωμοσώματα, ενώ, με εξαίρεση το χρωμόσωμα 3, η ανευπλοειδία φαίνεται να πλήττει σε μεγαλύτερο βαθμό τους ανοσοϊστοχημικά σταθερούς όγκους.⁸ Η λεμφοκυτταρική αντίδραση (κυρίως T-λεμφοκύτταρα CD3+) αποτελεί διαπιστωμένο συμβάν στους όγκους που εμφανίζουν μικροδορυφορική αστάθεια και για την εξήγηση της

καλύτερης πρόγνωσης των ασθενών (αυξημένο προσδόκιμο επιβίωσης, ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία) προτείνεται ακριβώς αυτή η εργώδης ανταπόκριση του ανοσιακού συστήματος και ο εγκλωβισμός του όγκου μέσα σ' αυτή τη λεμφοκυτταρική πλημμυρίδα, όπως συμβαίνει και σε μυελοειδούς τύπου καρκίνους άλλων οργάνων.⁹ Τέλος, πράγματι, διαπιστώθηκε εκλεκτικότητα στο υπόστρωμα ανάδυσης του όγκου, καθώς ~75% εξορμώνταν από το δεξιό κόλον, γεγονός που τους προσδίδει άλλη μια ιδιοτυπία.¹⁰ Ιδιαίτερο όμως ενδιαφέρον παρουσιάζουν διαπιστωμένες περιπτώσεις ασθενών με συνύπαρξη σποραδικών καρκινικών όγκων (ενδομητρίου, παχέος εντέρου ή μαστού), στους οποίους ταυτοποιείται το φαινόμενο της μικροδορυφορικής αστάθειας.¹¹ Οποσδήποτε, εκτός από την ανοσοϊστοχημική διερεύνηση, στην περίπτωση της μικροδορυφορικής αστάθειας απαραίτητος προβάλλει ο έλεγχος μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για την ταυτοποίησή της, όπως περιγράφηκε στην εισαγωγή.¹²

Η εφαρμογή του συστήματος των ιστικών μικροσυστοιχιών και η ποσοτική εκτίμηση με τα σύγχρονα υπολογιστικά συστήματα ανάλυσης εικόνας αποτελεί επανάσταση στη διαχείριση των ιστικών δεδομένων, ενώ η συνδυασμένη εφαρμογή ανοσοϊστοχημείας και χρωμογόνου *in situ* υβριδισμού (CISH) προσδίδει μια νέα διάσταση στις παθολογοανατομικές μελέτες. Πρέπει να σημειωθεί για τον τελευταίο ότι η αποτίμηση των σημείων γονιδίων ή χρωμοσωμάτων σε βιοπτικό υλικό υπόκειται στη σχετικότητα της αποτύπωσής τους στο εύρος των 4 ή 5 μm κατά τη μικροτόμηση του υλικού, ενώ πλέον αξιόπιστη προβάλλει ίσως η εφαρμογή της μεθόδου –με τροποποιημένο για τη φύση του υλικού πρωτόκολλο– σε κυτταρολογικό υλικό ενδοχειρουργικών επιχρισμάτων (intraoperative imprints), ενδοχειρουργικών βιοψιών με λεπτή βελόνη (intraoperative FNABs) ή επεξεργασμένο με τη μέθοδο της υγρής μονοεπίπεδης στιβάδας (ThinPrep), όπου διαφυλάσσεται η ακεραιότητα του πυρήνα και κατά συνέπεια μειώνεται η «αθέατη» μη μικροτομηθείσα ποσότητά του. Οι τελευταίες αυτές κυτταρολογικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται, λόγω της γνησιότητας του υλικού, από αυξημένη διαγνωστική ακρίβεια (~98%).

Τα συστήματα ιστικών μικροσυστοιχιών (tissue microarrays) προέκυψαν ως το αποτέλεσμα της αναζήτησης μεθόδων και τεχνολογίας για τη διαχείριση και έρευνα διαρκώς αυξανόμενου όγκου ιστικών δεδομένων.¹³ Αυτή η αδήριτη ανάγκη για σχεδιασμό και εκτέλεση πολυστιτικών μελετών με ταυτόχρονη συμπύκνωση του χώρου, του χρόνου και φυσικά του κόστους οδήγησε στην εφευρεσή τους. Η πρώτη δημοσιευμένη ανακοίνωση για τη

φιλοσοφία και την τεχνολογία του συστήματος προήλθε από τους Kononen et al “tissue microarrays for high – throughput molecular profiling of hundreds of specimens” (*Nat Med* 1998, 4:844–847) και έκτοτε οι δημοσιεύσεις αυξάνουν με γεωμετρική πρόοδο, πιστοποιώντας την τεράστια απήχηση του εγχειρήματος στο ερευνητικό παγκόσμιο στερέωμα.

Τα συνήθη συστήματα περιλαμβάνουν ως υλικοτεχνική υποδομή (hardware) μια τράπεζα, επί της οποίας φιλοξενείται ένα σύστημα δότη-δέκτη και ένα συμβατικό μικροσκόπιο. Το πλακίδιο εισέρχεται προς μικροσκόπηση και ο αντίστοιχος κύβος παραφίνης τοποθετείται στη θέση του δότη, ενώ παράλληλα ο κύβος από τον οποίο θα προκύψει η ιστική μικροσυστοιχία τοποθετείται στη θέση του δέκτη. Η συγχρονική κίνηση της τράπεζας επιτρέπει τη στόχευση, την αποκοπή και την εμφύτευση ιστικών κυλίνδρων που περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό ενσωματωμένων ιστικών κυλίνδρων –έως και 1000, διαμέτρου 0,6 mm– προερχόμενων από βιοπτικό υλικό διαφορετικών ασθενών. Οι κύβοι αυτοί μικροτομούνται και εφαρμόζονται ιστοχημικές ή ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, καθώς επίσης και μοριακές τεχνικές όπως ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH) ή ο χρωμογόνου *in situ* υβριδισμός (CISH), για την ανάδειξη πρωτεϊνών ή χρωμοσωμάτων και ειδικών γονιδιακών θέσεων, αντίστοιχα.

Η ευρεία χρήση των συστημάτων αυτών επιτρέπει πλέον και την άσκηση κριτικής για την αξιοπιστία και την ωφελιμότητα της μεθόδου. Όλοι συμφωνούν ότι αποτελούν επανάσταση στην τεχνολογία διαχείρισης μεγάλου όγκου ιστικών δεδομένων, με απώτερο στόχο τη συγκρότηση τεράστιων βιβλιοθηκών δεδομένων (tissue libraries). Το ζήτημα που τέθηκε προς προβληματισμό αναφερόταν στην αντιπροσωπευτικότητα του εμφυτευμένου ιστού σε σχέση με τον όγκο. Η ενδογενής ετερογένεια του νεοπλάσματος ως αποτέλεσμα αναδυόμενης πολυκλωνικής εξέλιξης αποτελεί ήδη δυσχερή κατάσταση για ιστικές ταυτοποιήσεις. Με δεδομένη τη συρρίκνωση του εξεταζόμενου δείγματος, καθώς μια σκηνωμένη σε παραφίνη συμβατική τομή αντικαθίσταται από έναν ιστικό κύλινδρο ελάχιστης διαμέτρου, εγείρεται ακριβώς το θέμα της αξιοπιστίας του τελικού αποτελέσματος μιας ανοσοϊστοχημικής ή μοριακής μελέτης και κατά πόσο αυτό εκφράζει ολόκληρη την παθολογία του εξεταζόμενου όγκου. Σύγχρονες συγκριτικές μελέτες, όπως των Camp et al, κατέδειξαν θετική συσχέτιση των αποτελεσμάτων μεταξύ συμβατικής και νέας τεχνικής κατά 95%, ενώ το ποσοστό αυτό μεταβλήθηκε σε 99%, όταν χρησιμοποιήθηκαν 4 ιστικοί κύλινδροι ανά περιστατικό.¹⁴ Η μελέτη αφορούσε στη διερεύνηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των δεικτών HER2/neu και

οιστρογονικών-προγεστερονικών υποδοχέων σε μαστικούς καρκίνους. Παρόμοια αποτελέσματα ανακοίνωσε η ομάδα των Hoos et al, διερευνώντας την ανοσοϊστοχημική έκφραση των δεικτών ki 67, p53 και rB σε ινοβλαστικούς όγκους με μέση τιμή σύγκρισης το ποσοστό του 94%, ενώ οι Robin et al, αναλύοντας 88 προστατικούς καρκίνους (10 ιστικούς κυλίνδρους από τον καθένα), διαπίστωσαν ότι σε 99% η ανοσοϊστοχημική έκφραση του ki 67 ήταν αντιπροσωπευτική, με μέγιστο αριθμό 3 ιστικών κυλίνδρων ανά περιστατικό.¹⁵

Εξετάζοντας από μηδενική βάση τη συσχέτιση συμβατικής και ειδικής τεχνικής πρέπει να αναλογιστούμε τα εξής αριθμητικά δεδομένα: Ο εγκλεισμένος σε συμβατικό κύβο παραφίνης ιστός καλύπτει μια επιφάνεια 3×2 cm περίπου. Με βάθος τομής 3 μm, ο εξεταζόμενος ιστικός όγκος προσεγγίζει τα 0,0018 cm³. Ένας ιστικός κύλινδρος διαμέτρου 0,6 mm περιλαμβάνει ιστικό όγκο 0,00000108 cm³ και αντιπροσωπεύει μόλις το 1/1600 του προαναφερόμενου συμβατικού. Όμως, ο συμβατικά εξεταζόμενος ιστικός όγκος σε ένα νεόπλασμα διαμέτρου 4 cm αποτελεί μόνο το 1/19000 και σε αντίστοιχο διαμέτρου 8 cm μόλις το 1/150000 του όλου νεοπλασματος. Γίνεται αντιληπτή, συγκρίνοντας τις αναφερόμενες τάξεις μεγεθών, η σχετικότητα που διέπει την αντιμετώπιση των συγκεκριμένων προς ανάλυση δειγμάτων, τόσο σε συμβατική όσο και σε μικροσυστοιχιακή

μορφή. Εντύπωση επίσης προκαλεί το συμπέρασμα, στο οποίο κατέληξε η ομάδα μελέτης του καρκίνου του μαστού με επικεφαλής τους Torhorst et al, κατά την ανάλυση των δεδομένων ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της p53 και συσχετισμού με την πρόγνωση του δείκτη. Ενώ τα TMA's κατέδειξαν την επιβεβαιωμένη συσχέτιση, οι συμβατικές τομές απέτυχαν να την πιστοποιήσουν.¹⁶

Το μέγεθος της σχετικότητας, λοιπόν, όσον αφορά στην αντιπροσωπευτικότητα του δείγματος, φαίνεται να μη σκιάζει την κύρια αρετή της μεθόδου, η οποία, σε συνδυασμό με την εφαρμογή των συστημάτων γονιδιακών μικροσυστοιχιών (c DNA arrays), αποτελεί την αιχμή του δόρατος στην εξέταση και την αποτίμηση της ιστικής πληροφορίας μεγάλου όγκου περιστατικών και σε συνδυασμό με τη σύγχρονη υπολογιστική ανάλυση εικόνας (digital image analysis) πυροδοτεί την εξέλιξη της μεταμοριακής εποχής.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Οι συγγραφείς επιθυμούν να ευχαριστήσουν τον κ. Γ. Βηλαρά και την κυρία Π. Τζουμακάκη (Τεχνολόγους στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του 417 ΝΙΜΤΣ) για την ποιότητα της εργασίας τους στην κατασκευή των ιστικών μικροσυστοιχιών, την ανοσοϊστοχημεία και τη μοριακή μελέτη.

ABSTRACT

Tissue microarrays in immunohistochemical expression and molecular detection of DNA MMR system instability in colorectal cancer

E. TSIAMBAS,¹ L. MANAIOS,² A. MELA,³ A. STAMATELOPOULOS,⁴ A. EMMANOUILIDOU,³ A. KARAMERIS¹

¹Department of Pathology, Laboratory of Image Analysis, 417 VA Hospital, ²Department of Surgery, 417 VA Hospital, ³Department of Clinical Cytology, 417 VA Hospital, ⁴Experimental Surgery Unit,

Medical School, University of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2006, 23(5):473-482

OBJECTIVE To evaluate immunohistochemical expression DNA MMR (mismatch repair system) proteins (MLH1, MSH2 and MSH6-GTBP) in sporadic colon adenocarcinomas, correlating the results with chromosomal instability of chromosome 2, 3, 9, 16 and 17. Microsatellite instability (MSI) in colorectal tumors can be detected in up to 15% of incident colorectal cancers. MSI in sporadic colorectal cancers is primarily due to epigenetic silencing of MLH1, while MSI is almost universal in tumors from HNPCC family members due to germline MMR gene mutation with loss or mutational inactivation of the second copy as a somatic event. There is evidence that tumor MSI is associated with a better outcome than the rest of large bowel malignancy.

METHOD Using tissue microarrays technology one paraffin block was created in which were embedded 60 histologically confirmed colon adenocarcinoma samples with a core diameter of 1 mm. Immunohistochemistry and chromogenic *in situ* hybridization were performed using an automated staining system. A computerized image analysis method was applied by the use of a semi-automated system. Statistical analysis was performed using the SPSS program. **RESULTS** Loss or low levels of expression were observed in 8/60 (13%) cases. A

high predominance of this event was observed in the expression of MLH1 (7/8, 85%). Aneuploidy of chromosome 2, 9, 16 and 17 was detected predominantly in the group of immunohistochemically stable cancers. In addition, 75% of cases which demonstrated combined loss of expression in at least 2 markers were characterized by lymphocytic infiltration. **CONCLUSIONS** Chromosomal instability is a common genetic event in colorectal cancers. A subset characterized by microsatellite instability and loss of expression in DNA MMR genes correlates with better prognosis (longer survival, response to chemotherapy).

Key words: Colorectal cancer, DNA MMR, Tissue microarrays

Βιβλιογραφία

- SMOLARZ B, ROMANOWICZ-MAKOWSKA H, LANGNER E, KOZLOWSKA E, KULIG A, DZIKI A. Genetic analysis of microsatellite markers in patients from hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Exp Oncol* 2004, 26:205–209
- MEYERS M, WAGNER MW, MAZUREK A, SCHMUTTE C, FISHEL R, BOOTHMAN DA. DNA mismatch repair-dependent response to fluoropyrimidine-generated damage. *J Biol Chem* 2004, 14:67–84
- TOMITA N, FUKUNAGA M, OKAMURA S, NAKATA K, OHZATO H, TAMURA S. The novel germline mutation of the *hMLH1* gene in a case of suspected hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) in a patient with no family history of cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004, 34:556–560
- PLEVOVA P, KREPELOVA A, PAPEZOVA M, SEDLAKOVA E, CURIK R, FORETOVA L. Immunohistochemical detection of the hMLH1 and hMSH2 proteins in hereditary non-polyposis colon cancer and sporadic colon cancer. *Neoplasma* 2004, 51:275–284
- SHIN YK, HEO SC, SHIN JH, HONG SH, KU JL, YOO BC ET AL. Germline mutations in MLH1, MSH2 and MSH6 in Korean hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mutat* 2004, 24:351–357
- REY JM, NORUZINIA M, BROUILLET JP, SARDA P, MAUDELONDE T, PUJOL P. Six novel heterozygous MLH1, MSH2, and MSH6 and one homozygous MLH1 germline mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2004, 155:149–151
- LEE DF, DROUIN R, PITSIKAS P, RAINBOW AJ. Detection of an involvement of the human mismatch repair genes *hMLH1* and *hMSH2* in nucleotide excision repair is dependent on UVC fluence to cells. *Cancer Res* 2004, 64:3865–3870
- LIPKIN SM, ROZEK LS, RENNERT G, YANG W, CHEN PC, HACIA J ET AL. The MLH1 D132H variant is associated with susceptibility to sporadic colorectal cancer. *Nat Genet* 2004, 36:694–699
- RENKONEN E, LOHI H, JARVINEN HJ, MECKLIN JP, PELTOMAKI P. Novel splicing associations of hereditary colon cancer related DNA mismatch repair gene mutations. *J Med Genet* 2004, 41:e95
- SMYTH EF, SHARMA A, SIVARAJASINGHAM N, HARTLEY J, MONSON JR, CAWKWELL L. Prognostic implications of *hMLH1* and *p53* immunohistochemical status in right-sided colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2004, 47:2086–2091
- TAKANO K, ICHIKAWA Y, UENO E, OHWADA M, SUZUKI M, TSUNODA H ET AL. Microsatellite instability and expression of mismatch repair genes in sporadic endometrial cancer co-existing with colorectal or breast cancer. *Oncol Rep* 2005, 13:11–16
- ΤΣΙΑΜΠΑΣ Ε. Μικροδορυφορική αστάθεια στον καρκίνο του παχέος εντέρου. *Ογκολογία Πεπτικού* 2002, 2:142–147
- SIMON R, MIRLACHER M, SAUTER G. Tissue microarrays in cancer diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2003, 3:421–430
- CAMP RL, DOLLED-FILHART M, KING BL. 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* 2003, 63:1445–1448
- RUBIN M, DUNN R, STRAWDERMAN M. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol* 2002, 26:312–319
- TORHORST J, BUCHER C, KONONEN J, HAAS P, ZUBER M, KOCHLO OR ET AL. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical end points. *Am J Pathol* 2001, 159:2249–2256

Corresponding author:

E. Tsiambas, 19B Symis street, GR-153 41 Agia Paraskevi, Greece