

KORELACIJA EKSPRESIJE HER 2 PROTOONKOGENA SA MAKROSKOPSKOM MANIFESTACIJOM I NAČINOM RASTA KOLOREKTALNIH KARCINOMA

Jelena Lukić-Flora¹, Dušica Petrović², Vesna Stanković³, Miloš Milosavljević² i
Vladimir Bulatović²

Karcinom debelog creva jedan je od najčešćih malignih tumora i drugi po redu uzročnik smrti od karcinoma u razvijenim zemljama.

Cilj istraživanja bilo je ispitivanje ekspresije HER2 kod kolorektalnog karcinoma kao i komparacija nivoa ekspresije HER2 sa makroskopskim izgledom i načinom rasta tumora, zatim detekcija i identifikacija nivoa ekspresije protoonkogenog HER2 kao značajnog prognostičkog faktora daljeg toka, ishoda bolesti i podatka za izbor adekvatne terapije.

Istraživanje je urađeno kao prospektivna, kliničko-eksperimentalna studija. Korišćen je postoperativni materijal dobijen resekcijom kolorektalnog karcinoma od 63 bolesnika oba pola.

Positivan HER2 status bio je u 9.5% tumora. Dobijeni rezultati pokazali su da se najveći broj tumora 36/63, tj. 57.1% manifestovao u vidu infiltrativne forme, 9/63, tj. 14.3% kao ulcerišuća forma, a 18/63, tj. 28.6% tumora imalo je polipoidni – egzofitičan izgled. Rezultati su pokazali da je 31 tumor infiltrativne forme bio HER2 negativan a 5 ih je bilo HER2 pozitivno. Kod tumora ulcerišuće forme 9 je bilo HER2 negativno, a nije bilo pozitivnih HER2 tumora. Kod tumora vegetativne forme 17 je bilo HER2 negativno, a samo 1 je bio HER2 pozitivan.

Ekspresija HER2 je izostala u 90,5% tumora i ne korelira sa makroskopskim izgledom i načinom rasta tumora. Nivo ekspresije HER2 nema dijagnostički, prediktivni i prognostički potencijal, dok je neosporna njegova važnost u razumevanju onkogeneze. *Acta Medica Medianae 2011;50(4):5-10.*

Ključne reči: kolorektalni karcinom, HER 2, korelacija, makroskopski izgled, način rasta

Opšta bolnica, Pančevo, Srbija¹
Centar za patološko-anatomska dijagnostiku, Klinički centar
Kragujevac, Kragujevac, Srbija²
Univerzitet u Kragujevcu, Medicinski fakultet, Kragujevac,
Srbija³

Kontakt: Dušica Petrović
Centar za patološko-anatomska dijagnostiku
Klinički centar Kragujevac
Zmaj Jovina 30, 34000 Kragujevac, Srbija
E-mail: dusica@euro-net.org

Uvod

Karcinom debelog creva jedan je od najčešćih malignih tumora i drugi po redu uzročnik smrti od karcinoma u razvijenim zemljama (1).

Procesi deobe, diferencijacije i smrti ćelije strogo su kontrolisani a poremećaj u regulaciji bilo kog od njih uzrokuje nastanak klona ćelija koji se autohtono, nesvršishodno razmnožava i produkuje tumorsku masu. Nastanak tumora je kompleksan proces u koji su uključeni mnogobrojni genetski i molekularni mehanizmi. Kancerogeneza je posledica akumulacije poremećaja u građi i funkciji gena koji

regulišu mehanizme proliferacije ćelije, reparacije DNK molekula ili programirane smrti ćelija. Ti geni su: onkogeni, tumor supresor geni, geni koji su matrica za sintezu enzima reparatornog sistema, kao i geni koji kontrolišu apoptozu (2).

U genomu čoveka normalno su prisutni protoonkogeni čiji proteinski produkti učestvuju u prenošenju signala koji kontrolišu proliferaciju ćelija. Mutirani protoonkogeni su onkogeni, a njihovi produkti onkoproteini(3), posredstvom receptora i solubilnih faktora koji se vezuju za njih, ćelija komunicira sa okolinom, a poremećaji u prenošenju signala od ćelijske membrane do jedra mogu prouzrokovati promenu mitotske aktivnosti ili sposobnosti diferencijacije (4). HER 2 (humani epidermalni faktor rasta receptor) iz familije EGFR je transmembranski, glikoproteinski receptor koga kodira gen sa hromozoma 17. U uslovima transformacije ćelije – izmenjene fiziološke strukture i funkcije u smislu kontrole ćelijskog ciklusa i smrti – povećana ekspresija HER 2 svrstava u onkoproteine (5).

Ligand za HER2 još uvek nije identifikovan, ali se smatra da je to molekul koji pripada HRG

(heregulin) familiji. HER2 i HRG geni su geni koji su najviše splajsovani, tj. sa najviše egsona i introna, što znači da imaju puno proteinskih formi (izoforni). Članovi EGFR i HRG familije su bivalentni i na taj način receptori familije HER međusobno homo- i heterodimerizuju vezujući se za različite izoforme liganda, na taj stvarajući specifičnu mrežu transdukcije signala kroz ćeliju, jer svaka kombinacija receptor-ligand ima sopstveni put prenosa signala kroz ćeliju. To dalje modifikuje ekspresiju gena koja menja ćelijski fenotip i funkciju u smislu izmenjene prezentacije molekula na površini ćelije i sinteze specifičnih proteina (6-8). Rezultat hiperaktivnosti ovih puteva prenosa signala kroz ćeliju, dovodi do ekspresije i aktivacije proteina koji dovode do razvoja ćelijskog ciklusa i sprečavanja ćelijske smrti. Pogrešna ekspresija bilo kog enzima ili proteina iz kaskade prenosa signala kroz ćeliju dovoljna je da naruši ravnotežu kontrole razvoja ćelijskog ciklusa i apoptoze.

Postoji nekoliko morfoloških tipova kolorektalnog karcinoma: prstenasti (anularni), vegetantni (polipoidni), infiltrativni i ulcerišući tumori (9).

Na levoj strani većinu kolorektalnih karcinoma čine prstenaste lezije koje znatno sužavaju lumen i često uzrokuju posledično proširenje proksimalnog dela creva. Rubovi prstena su uzdignuti i čvrsti, dok je središnji deo obično ulcerisan. Ove neoplazme vremenom (tokom godina) penetriraju zid creva, pa se mogu javiti kao subserozna ili serozna, čvrsta beličasta zadebljanja. Njihove metastaze se šire u regionalne limfne čvorove i jetru, a kasnije i udaljene organe (9,10).

Karcinomi desnog kolona imaju uglavnom polipoidni, pečurkasti izgled i prominiraju u lumen poput "karfiolastih" masa. Ove lezije su retko ulceroznog tipa ili u obliku plaka. Bez obzira na makroskopski izgled, tumori penetriraju zid creva i šire se u mezenterijum i regionalne limfne čvorove. Moguće je da se dalje diseminiraju u jetru i druge organe (9, 10, 11).

Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje ekspresije HER2 na operativnom materijalu - reseciranom segmentu bolesnika sa kolorektalnim karcinomom, komparacija nivoa ekspresije HER2 sa makroskopskim izgledom i načinom rasta tumora, utvrđivanje mogućeg prognostičkog značaja te korelacije, i detekcija i identifikacija nivoa ekspresiranosti HER2 kao značajnog prognostičkog faktora daljeg toka i ishoda bolesti i podatka za izbor adekvatne i individualne antitumorske terapije.

Materijal i metode

Istraživanje je urađeno kao prospektivna, kliničko-eksperimentalna studija. Korišćen je postoperativni materijal dobijen resekcijom kolorektalnog tumora od 63 bolesnika oba pola sa Hirurške klinike Kliničkog centra „Kragujevac“ u Kragujevcu. U cilju dobijanja što više relevantnih patohistoloških podataka korišćene su rutinska Hematoksilin - Eozin (HE) metoda i imunohisto-

hemijske metode obavljene u Centru za patološko-anatomsku dijagnostiku KC „Kragujevac“ u Kragujevcu.

Rutinska HE metoda korišćena je za patohistološku verifikaciju tumora, kao i patohistološku analizu. U rutinskoj obradi preparata, uzorci tkiva su fiksirani u 4% neutralnom puferisanom rastvoru formalina, u toku 24h, na sobnoj temperaturi. Po završenoj fiksaciji, dehidratirani su provođenjem kroz seriju alkohola rastuće koncentracije (70%, 96% i 100%), prosvetljavani u ksilolu i kalupljeni u parafin. Preseci tkiva, debljine 4 µm, sečeni su mikrotomima Leica SM 2000R i Leica Reinhart Austria.

Posle deparafinisanja u ksilolu i hidratacije u opadajućem redu alkohola, isecci su bojeni Haematoxylin-om po Mayer-u, prosvetljavani u 2% rastvora eozina, zatim dehidratirani, prosvetljivani i montirani na pločice sa Canada balzomom (12, 13, 14).

Imunohistohemijske metode korišćene su za identifikaciju ekspresije antigena na resektatu kolorektalnog karcinoma. Procedura imunohistohemijskog bojenja podrazumevala je postupke demaskiranja antigena, blokiranja endogene peroksidaze, inkubiranja preparata sa primarnim antiserumom i postupak izvođenja imunohistohemijske metode - LSAB+ - HRP (15).

Evaluacija rezultata HER2 ekspresije učinjena je u skladu sa kriterijumima preporučenim od strane proizvođača („DAKO - Hercep Test“). Procena se zasniva na određivanju tri parametra: procentu tumorskih ćelija, čija membrana pokazuje imunoreaktivnost (granična vrednost je 10%) kontinuiranosti, tj. diskontinuiranosti i intenzitetu imunoreaktivnog bojenja membrane. Imunološki kriterijum za ocenu ekspresije HER2:

- 0 - nema obojenosti ili je membranska obojenost najmanje 10% tumorskih ćelija
- 1+ - jedva obojena membrana u više od 10% tumorskih ćelija
- 2+ - slaba ili srednja obojenost cele membrane u više od 10% tumorskih ćelija
- 3+ - jaka obojenost cele membrane u više od 10% tumorskih ćelija

0 i 1+ su negativni rezultat a 2+ i 3+ su pozitivan nalaz

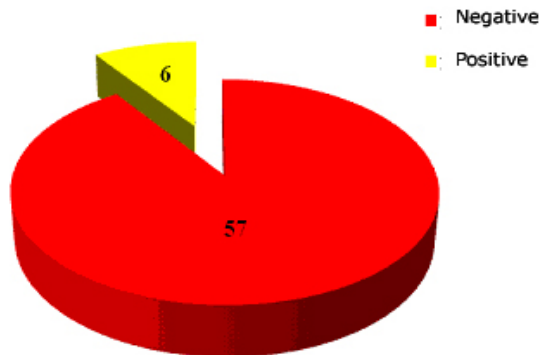
Citoplazmatska ekspresija nije bila uključena u ocenu pozitivnosti.

Imunohistohemijska bojenja izvedena su uz kontrolu kvaliteta i specifičnosti bojenja, primenom pozitivnih i negativnih kontrola prema propozicijama UK NEQAS (engl. UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry). Za statističku obradu podataka korišćen je programski paket SPSS i metode deskriptivne statistike (frekvencije, procenti, medijane, percentili. Ispitivanje zavisnosti dve opisane promenljive realizovana je pomoću Hi-kvadrat testa i Fišerovog testa. Ispitivanje uticaja više promenljivih na binarnu promenljivu urađeno je pomoću multivarijante binarne logističke regresije.

Results

Najveći broj tumora 36/63, tj. 57.1% manifestovao se u vidu infiltrativne forme, 9/63, tj. 14.3% kao ulcerišuća forma, a 18/63, tj. 28.6% tumora je imalo polipoidni – egzofitičan izgled (tabela 1).

Ekspresija HER2 nije bila prisutna u 57/63, tj. 90.5% tumora. Pozitivan HER2 status bio je u 6/63, tj. 9.5% tumora, odnosno, dokazana je kontinuirana membranska imunoreaktivnost umerenog i visokog intenziteta (u više od 10% tumorskih ćelija) (tabela 2, Slika 1).



Slika 1. Ekspresija HER 2

Tabela 1: Makroskopska manifestacija tumora

Makroskopska manifestacija tumora	Učestalost	Procenat (%)
Vegetantna	18	28,6
Ulcerišuća	9	14,3
Infiltrativna	36	57,1
Ukupno	63	100,0

Tabela 2: Ekspresija HER2

Ekspresija HER2	Učestalost	Procenat (%)
Negativan	57	90,5
Pozitivan	6	9,5
Ukupno	63	100,0

Tabela 3: Korelacija makroskopske manifestacije tumora i HER2

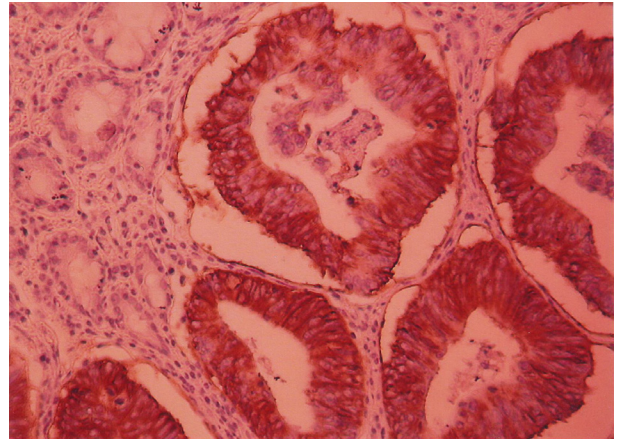
Makroskopska manifestacija tumora	HER2-	HER2+	Procenat (%) -	Procenat (%) +
Vegetantna forma	17	1	94.44	5.56
Ulcerišuća forma	9	0	100	0
Infiltrativna forma	31	5	86.11	13.89

Rezultati su pokazali da je 31 tumor infiltrativne forme bio HER2 negativan a 5 ih je bilo HER2 pozitivno. Kod tumora ulcerišuće forme 9 je bilo HER2 negativno, a nije bilo pozitivnih HER2 tumora. Kod tumora vegetativne forme 17 je bilo HER2 negativno, a samo 1 je bio HER2 pozitivan (tabela 3).

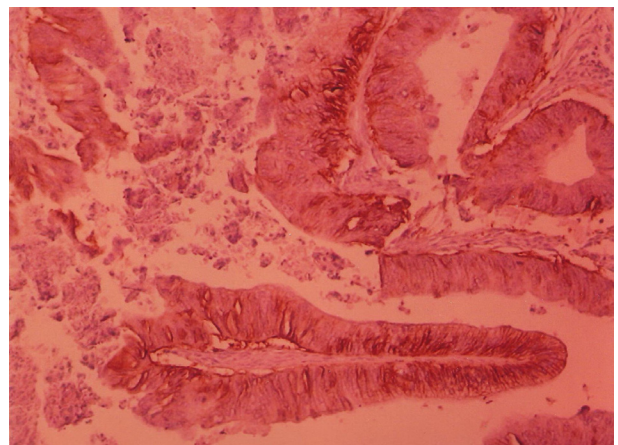
Makroskopska manifestacija tumora i HER2 su nezavisni ($p = 1,355$).

U cilju dobijanja pouzdanih parametara koji bi ispitali različite parametre koji bi mogli da utiču na ekspresiju HER2 urađena je binarna logistička regresija.

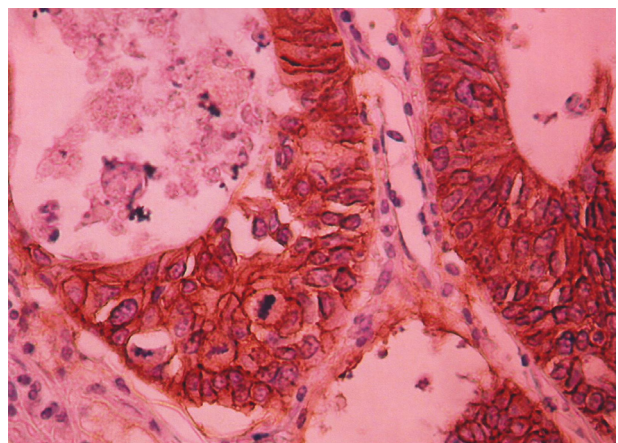
Prikazani rezultati pokazali su da HER2 ne zavisi ni od jednog kliničkog i patohistološkog parametra (Slika 2-5)..



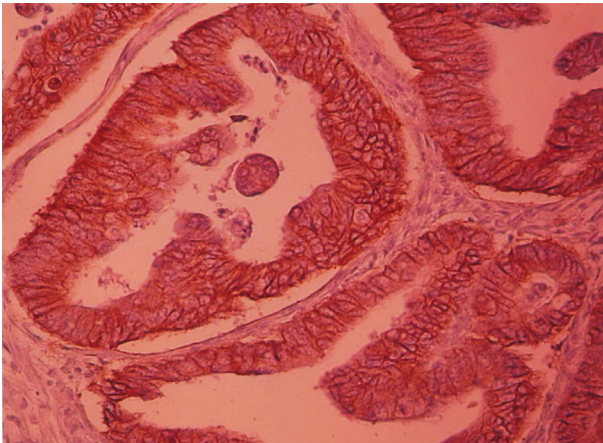
Slika 2. HER2 –unutrašnja negativna kontrola (IHH,x 200)



Slika 3. HER 2=1, slaba obojenost cele membrane više od 10% tumorskih ćelija (IHH x 200)



Slika 4. HER2=2+, umerena obojenost cele membrane više od 10% tumorskih ćelija (IHH x 400)



Slika 5. HER2=3+, više od 10% tumorskih ćelija pokazuje kontinuiranu imunoreaktivnost visokog intenziteta (IHH x 200)

Discussion

Kolorektalni karcinom (KRK) predstavlja jedan od najčešćih uzroka morbiditeta i mortaliteta kako u zapadnom svetu tako i na našim prostorima. Klasifikacije i ustanovljeni prognostički parametri koji se danas koriste u terapiji KRK još uvek samo delimično obezbeđuju informacije o toku i ishodu ove bolesti, tako da postoji stalna potreba za unapređenjem postojećih i identifikacijom novih dijagnostičkih i prognostičkih markera. U tom smislu posebno je važna identifikacija molekularnih markera koji bi pružili uvid u potencijalno ponašanje ili agresivnost tumora (16-18).

Kako postojeći kliničko-morfološki parametri (histološki tip tumora, stepen diferencijacije, tumorski stadijum, nodalni status, invazija vaskularnih struktura i hirurške margine) još uvek zadržavaju svoj dominantni značaj u dijagnostičkim procedurama, molekularno profiliranje bi doprinelo njihovom upotpunjavanju, najčešće u smislu prepoznavanja odgovora na primenjenu terapiju (genetske promene) ili u smislu primene u unapređenju skrining programa rizičnih kategorija koji bi omogućili blagovremeno i uspešno lečenje (19).

Najveći broj tumora, 36/63, tj. 57.1%, manifestovao se u vidu infiltrativne promene, 9/63, tj. 14.3% kao ulcerišuća forma, a 18/63, tj. 28.6% tumora imalo je polipoidni – egzofitičan izgled.

Rezultati ove studije pokazali su ekspresiju u 9,5% tumora, gde se raspon ekspresije HER2 kreće od 0 do 85% u dostupnoj literaturi, što korelira sa prezentovanim rezultatima (20). Međutim, prema istim literaturnim podacima, kontradiktorni rezultati dobijeni su kada je primenjena druga metoda određivanja HER2 statusa (Hercept Test – kit-a (DAKO, Glostrup, Danska)), što sugeriše da bi izbor metodologije mogao da utiče na rezultat dobijene ekspresije.

Istraživanja pokazuju da samo ¼ bolesnika sa overekspresijom HER2 daje povoljan odgovor na terapiju Herceptinom. Cilj je da se ovaj lek i njegova potencijalna uloga utvrde, s obzirom da postoje validne metode detekcije bolesnika sa KRK. Ovakav rezultat je posledica nedovoljno standardizovane metode, tipa antitela, tkiva koje se koristi, neadekvatno skladištenje i citoplazmatska prezentacija HER2 koja nije na meti herceptina. FISH koristi objektivnije bodovanje, osetljivost je 96% a specifičnost 100%. IHH je jeftina, dostupna i zahteva rutinsku mikroskopiju. FISH je skupa metoda, zahteva fluorescentnu mikroskopiju i teško razlikuje tumorske ćelije od strome (21).

Ekspresije HER2 ne zavise od makroskopske manifestacije tumora i načinom rasta tumora, odnosno, nema korelacije između ekspresije HER2 sa makroskopskom manifestacijom i načinom rasta KRK, koja bi poslužila kao prognostički faktor daljeg toka i ishoda bolesti.

Conclusion

Ekspresija HER 2 je izostala u 90,5% tumora i ne korelira sa makroskopskom manifestacijom i načinom rasta kolorektalnih karcinoma.

Iz svega prethodno navedenog moglo bi da se zaključi da u dosadašnjim studijama nije dokazana uloga HER 2 kao važnog prognostičkog pokazatelja. Evaluacija gena i molekularno profiliranje može olakšati identifikaciju grupe bolesnika sa overekspresijom HER 2, što bi moglo implicirati određene terapijske intervencije i važan skrining za target terapijske ciljeve.

Nivo ekspresije HER 2 nema dijagnostički, prediktivni i prognostički potencijal, dok je neosporna njegova važnost u razumevanju onkogeneze.

Literatura

1. Hamilton SR. Pathology and biology of colorectal cancer. In: Young G, Levin B, Rozen A (editors). Prevention and early detection of colorectal cancer. London: WB Saunders; 1996. pp 3-23.
2. Compton C. Colorectal carcinoma: Diagnostic, prognostic and molecular features. Mod Pathol 2003; 16(4): 376-81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Alberts B, Bray D, Lewoy J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell. New York: Garland Publ; 2002.
4. Sternberg SS. Histology for Pathologists. Philadelphia-New York: Lippincot-Raven; 1996.
5. Kim R, Tanabe K, Uchida Y, Osaki A, Toge T. The role of HER-2 oncoprotein in drug-sensitivity in breast cancer. Oncol Rep 2002; 9(1): 3-9. [[PubMed](#)]
6. Ross S, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. Stem Cells 1998; 16(6): 413-28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Hanna WM, Kahn HJ, Pienkowska M, Blondal J, Seth A, Marks A. Defining a test for HER-2/neu evaluation in the breast cancer in the diagnostic setting. Mod Pathol 2001; 14: 677-85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Rubin E, Farber J. Pathology. J.B. Philadelphia: Lippincott Company; 1994.
9. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of diseases. 5th edition. Philadelphia: WB Saunders Co; 1994.
10. Cancer facts and figures 1997. Atlanta: American Cancer Society, 1997.
11. Benedix F, Kube R, Meyer F, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H. Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival. Dis Colon Rectum. 2010; 53(1):57-64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bancroft JD and Gamble M, editors. Theory and practice of histological techniques. 5th edition. Edinburgh, London, New York, Oxford: Churchill Livingstone; 2002.
13. Totty AB. The Mucins. In: Theory and practice of histological techniques, Bancroft JD, Gamble M.(eds). 5th edition. Edinburgh, London, New York, Oxford: Churchill Livingstone; 2002.
14. Miller K. Metodologija imunohistohemijskog bojenja. Protokoli za citokeratin, dezmin, S-100, HMB45, LCA, CD3, CD20. Beograd: Seminar; 2002.
15. Soliani P, Ziegler S, Romani A, Corcione L, Campanini N, Dell'Abate P, et al. Prognostic significance of nm23 gene product expression in patients with colorectal carcinoma treated with radical intent. Oncol Rep 2004; 11(6): 1193-200. [[PubMed](#)]
16. Zhao D, Ding X, Peng J, Zheng Y, Zhang S. Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma. J Zhejiang Univ Sci B 2005; 6(12): 1163-9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Torsello A, Garufi C, Cosimelli M, Diodoro MG, Zeuli M, Vanni B, et al. P53 and bcl-2 in colorectal cancer arising in patients under 40 years of age: Distribution and prognostic relevance. Eur J Canc 2008; 44: 1217-22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Bernstein CN, Shanahan F, Weinstein WM. Are we telling patients the truth about surveillance colonoscopy in ulcerative colitis? Lancet 1994; 343(8889): 71-4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ross JS, McKenna BJ. The Her-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. Cancer Invest 2001; 19: 554-68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kavanagh DO, Chambers G, O'Grady L, Barry KM, Waldron RP, Bennani F. Is overexpression of HER-2 a predictor of prognosis in colorectal cancer? BMC Cancer 2009; 9:1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

CORRELATION OF HER 2 PROTO-ONCOGENE EXPRESSION WITH THE MACROSCOPIC MANIFESTATION AND GROWTH PATTERN OF COLORECTAL CANCER

Jelena Lukić-Flora, Dušica Petrović, Vesna Stanković, Miloš Milosavljević and Vladimir Bulatović

Colon carcinoma is one of the most common malignant tumours and the second cause of cancer deaths in developed countries.

The objective of this study is to investigate the expression of HER2 in colorectal cancer and compare the expression levels of HER2 with the macroscopic appearance and manner of growth of the tumours, followed by detection and identification of the expression levels of proto-oncogene HER2 as an important prognostic factor of the further course, outcome and the data for the selection of appropriate therapy.

This was a prospective, clinical and experimental study. Postoperative material obtained by resection of colorectal cancer from 63 patients of both sexes was used in the study.

HER2 status was positive in 9.5% of the tumours. The results showed that the majority of tumours 36/63, i.e. 57.1% were manifested as infiltrative forms, 9/63, i.e. 14.3% as ulcerating form, and 18/63, i.e. 28.6% of tumours had a polypoid – exophytic form. The results show that 31 tumours of infiltrative forms were HER2 negative and 5 of them were HER2 positive. In tumours with ulcerating form 9 were HER2 negative, and there were no HER2 positive tumours. In vegetative tumour forms 17 were HER2 negative, and only 1 was HER2 positive.

HER2 expression was absent in 90.5% of the tumours and does not correlate with the macroscopic appearance and manner of tumour growth. Expression level of HER2 does not have a diagnostic, predictive and prognostic potential, while its importance is undeniable in the understanding of oncogenesis. *Acta Medica Medianae 2011; 50(4):5-10.*

Key words: colorectal cancer, HER 2, correlation, macroscopic appearance, growth pattern