



Expression of the selected adhesive molecules (cadherin E, CD44, LGAL3 and CA50) in papillary thyroid carcinoma

Barbara Nikiel¹, Mykola Chekan¹, Magdalena Jaworska¹, Michał Jarząb², Beata Maksymiuk¹, Dariusz Lange¹

¹Department of Tumor Pathology,

²Department of Tumor Biology,

Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

Abstract

Introduction: The aim of the study was to determine the expression of selected adhesive molecules in papillary thyroid carcinoma.

Material and methods: 47 papillary thyroid carcinoma cases and 11 nonmalignant goiter cases were analyzed by immunohistochemistry.

Results: Galectin-3 (LGAL3) was a sensitive and specific marker, present in 91% of analyzed tumors and only in 5% of tumor margin. The presence of CA50 was 86% and 3% respectively with only 3% positive non-malignant cases. Cadherin E expression was noted in 91% of primary tumors, in 84% of the surrounding tissue and in 63% of non-malignant goiter. CD44 (DF1485) was observed in 89% of primary tumors and 48% of surrounding tissue; the reaction with BBA10 was more characteristic for metastases.

Conclusions: Our study confirms the high diagnostic value of galectin-3 in papillary thyroid carcinoma and reveals the similar efficiency of CA50. CD44 (DF1485) expression in primary tumor is more intensive than in surrounding tissue,

but the diagnostic importance is not high because it is often observed in benign lesions. Using of BBA10 is more sensitive, but less specific. High expression of cadherin E in benign lesions impairs its diagnostic application in papillary thyroid cancer.

(*Pol J Endocrinol* 2006; 4 (57): 326–335)

Key words: papillary thyroid carcinoma, adhesive molecules, galectin-3, CA50 antigen



Barbara Nikiel, MSc
Department of Tumor Pathology,
Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center
and Institute of Oncology, Branch Gliwice
Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice
phone: 032 278 94 01, fax: 032 278 94 15
e-mail: basia-ni@o2.pl



Ekspresja wybranych molekuł adhezyjnych (kadheryny E, CD44, LGAL3 i CA50) w raku brodawkowatym tarczycy

Barbara Nikiel¹, Mykola Chekan¹, Magdalena Jaworska¹, Michał Jarzab², Beata Maksymiuk¹, Dariusz Lange¹

¹Zakład Patologii Nowotworów,

²Zakład Biologii Nowotworów,

Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy było określenie ekspresji wybranych molekuł adhezyjnych w tkance raka brodawkowego tarczycy zarówno w guzie pierwotnym, jak i w przerzutach do węzłów chłonnych oraz ocena ich przydatności dla celów diagnostycznych i prognostycznych.

Materiał i metody: Badaniem objęto grupę 47 chorych na raka brodawkowego tarczycy i 11 chorych operowanych z powodu wola niezłośliwego. Badania przeprowadzono metodą immunohistochemiczną.

Wyniki: Pod względem znaczenia diagnostycznego wśród badanych markerów galektyna-3 okazała się jednym z najbardziej czułych i swoistych, o czym świadczy różnica między guzem (91% przypadków dodatnich) a otoczeniem (5%). Molekuła adhezyjna CA50 występowała prawie tak samo często w guzie pierwotnym (86% przypadków), jak i przerzutowym (85%). Jej obecność w otoczeniu zaobserwowano tylko w jednym przypadku (3%), reakcja miała charakter ogniskowy. Kadheryna E występowała w 91% przypadków guza pierwotnego i 84% otoczenia. Dodatnią reakcję obserwowano również w 63% przypadków wola guzkowego. Molekuła CD44, klon DF1485, był obecny w 100% przerzutów do węzłów chłonnych, w 89% guzów pierwotnych i w 48% przypadków otoczenia guza. Molekuła CD44, klon BBA10, występował częściej w przerzutach. **Wnioski:** Spośród badanych markerów największą wartość diagnostyczną w raku brodawkowatym tarczycy wykazał

antygen CA50 i galektyna-3. Ekspresja CD44 (DF1485) w guzie pierwotnym jest znacznie silniejsza niż w otoczeniu, jednak jego wartość diagnostyczna jest niepewna, gdyż występuje on często w zmianach łagodnych tarczycy. Zastosowanie przeciwciała BBA10 zwiększa czułość metody, ale zmniejsza jej swoistość. Częste występowanie kadheryny E w komórkach raka brodawkowego tarczycy, otoczeniu guza i zmianach łagodnych tarczycy nie pozwala na jej zastosowanie diagnostyczne.

(*Endokrynol Pol* 2006; 4 (57): 326–335)

Słowa kluczowe: rak brodawkowy tarczycy, molekuły adhezyjne, galektyna-3, antygen CA50



mgr Barbara Nikiel
Zakład Patologii Nowotworów,
Centrum Onkologii — Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie,
Oddział w Gliwicach
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice
tel.: 032 278 94 01, faks: 032 278 94 15
e-mail: basia-ni@o2.pl

Wstęp

Adhezja komórkowa to dynamiczny proces, dzięki któremu komórki łączą się ze sobą nawzajem i z macierzą zewnątrzkomórkową. Obejmuje procesy sygnalizacyjne, które kontrolują przepływ informacji pomiędzy sąsiednimi komórkami. Podczas embriogenezy interakcje adhezyjne są istotne dla procesów morfogenezy. Silną współzależność między ekspresją molekuł adhezyjnych a strukturą tworzącej się tkanki zaobserwowano, na przykład w badaniach nad lokalizacją winkuliny, która wiąże wewnątrzkomórkową domenę kadheryny w ty-

reocytach w zależności od organizacji struktury nabłonka (w układzie jednowarstwowym lub pęcherzykowym) [1]. Receptory adhezyjne odgrywają zasadniczą rolę w morfogenezie, utrzymywaniu integralności i migracji komórek nabłonka. Największe rodziny receptorów adhezyjnych to: immunoglobuliny, kadheryny, integryny, selektyny i CD44 [2, 3]. W niniejszej pracy analizowano ekspresję kilku molekuł adhezyjnych należących do różnych klas, w tym kadheryny E, antygeny CD44, galektyny-3 oraz antygeny węglowodanowego CA50.

Kadheryna E (CDH1)

Kadheryny są zbudowane z domeny zewnątrzkomórkowej, która wymaga obecności jonów Ca^{2+} do tworzenia połączeń homofilowych między przylegającymi komórkami, domeny transbłonowej i domeny wewnątrzkomórkowej, łączącej się z białkami zwanymi kateninami (α , β , γ), a za ich pośrednictwem z cytoszkieletem [4]. Kompleks kadherynowo-kateninowy bierze udział we wzmacnianiu mechanicznych właściwości połączeń adhezyjnych i odgrywa ważną rolę w morfogenezie i kontroli wzrostu komórek [5]. Zaburzenia w syntezie α -kateniny lub wewnątrzkomórkowej domeny kadheryny E (CDH1) są przyczyną powstania komórek niezdolnych do agregacji i adhezji [6]. W badaniach molekuł adhezyjnych ważne jest nie tylko to, czy badana substancja występuje w tkance, ale również to, czy jej lokalizacja komórkowa jest prawidłowa. CDH1 występuje w błonie komórkowej nabłonka, a jej utrata lub przesunięcie z błony do cytoplazmy wiąże się z odróżnicowaniem komórek, wzrostem inwazyjności miejscowej nowotworu i wystąpieniem przerzutów, a zatem gorszym rokowaniem [7]. Uważa się z jednej strony, że to właśnie kadheryna E pełni decydującą rolę w regulacji procesów adhezji komórek nabłonkowych oraz że istnieje ścisły związek między inwazyjnością nowotworu i jej supresyjnym działaniem [8]. Obniżona ekspresja kadheryny E oraz α -i- β -kateniny w pierwotnym raku jelita grubego jest niezależnym, negatywnym czynnikiem prognostycznym. Z drugiej strony, występująca w prawie połowie przerzutów do węzłów chłonnych, wyższa niż w guzie pierwotnym ekspresja molekuł adhezyjnych wiąże się z gorszym rokowaniem. Podobnie, krótszy jest też czas przeżycia chorych z przerzutami do wątroby, wykazującymi podwyższoną ekspresję molekuł adhezyjnych [9].

Rolę CDH1 analizowano także w raku pęcherza moczowego, a otrzymane wyniki sugerują, że kadheryna ta wpływa na inwazyjność komórek raka pęcherza, gdyż jej zaburzona ekspresja wiąże się ze wznowami, progresją i krótszym czasem przeżycia [8].

Antygen CD44

Antygen CD44 należy do odrębnej rodziny cząsteczek adhezyjnych i jest wielofunkcyjną glikoproteiną, która bierze udział w licznych interakcjach międzykomórkowych, takich jak: połączenia limfocytów ze śród-błonkiem, adhezja komórek do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, limfohematopoeza, adhezja homotypowa, aktywacja limfocytów T, uwalnianie cytokin i ruch boczny komórek [10]. Występuje w postaci wielu izoform, których obecność jest wynikiem alternatywnego składania mRNA. Wielkość cząsteczki poszczególnych izoform CD44 zależy od liczby eksonów zaangażowanych w ich powstawanie. Mniejsze występują na

powierzchni komórek układu krwiotwórczego, fibroblastów i komórek glejowych, a większe na komórkach nabłonka. Ligandami dla CD44 są takie składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, jak fibronektyna i kolagen [10]. Uważa się, że CD44 może ułatwiać degradację macierzy zewnątrzkomórkowej przez regulację aktywności proteaz zdolnych do trawienia jej komponentów. Głównymi enzymami degradującymi są metaloproteinazy (MMPs, *matrix metalloproteinases*), których sprawne funkcjonowanie jest konieczne dla remodelowania tkanki podczas rozwoju, resorpcji kości, gojenia ran i angiogenezy, a także do infiltracji tkanek przez leukocyty i komórki nowotworowe. Antygen CD44 wpływa na inwazyjność nowotworu poprzez udział w umieszczeniu proteolitycznie aktywnej MMP9 na powierzchni komórek guza [11]. Metaloproteinazy niszczą błonę podstawną, a CD44 bierze udział w formowaniu inwadopodiów poprzez wiązanie domeny cytoplazmatycznej z ankiryną do systemu kurczenia się aktynomiozynowego związanego z błoną i w ten sposób przyczynia się do migracji komórek [12].

Galektyna-3

Galektyna-3 (LGAL3) to proteina o masie około 30 kDa należąca do lektyn wiążących β -galaktozydy [13, 14]. Galektyny biorą udział w adhezji międzykomórkowej i do macierzy zewnątrzkomórkowej, we wzroście komórek, regulacji cyklu komórkowego i apoptozie, a także transformacji nowotworowej. W komórkach pęcherzykowych tarczyc płodowych wykazano niską ekspresję galektyny-1 i brak ekspresji galektyny-3. Sugeruje to, że galektyna-1 może być uznana za antygen rakowo-płodowy, a galektyna-3 powstaje w nich *de novo* podczas transformacji nowotworowej [15]. Występowanie tych galektyn w łagodnych i złośliwych guzach tarczycy było również przedmiotem badań Xu i wsp. Nowotwory złośliwe pochodzenia pęcherzykowego charakteryzowała silna ekspresja galektyny-1 i galektyny-3, natomiast zarówno w przylegającej do nich prawidłowej tkance tarczycy, jak i w zmianach łagodnych reakcja ta nie występowała. Słabą reakcją zaobserwowano również w komórkach okołopęcherzykowych. Według autorów świadczy to o tym, że obecność galektyny wiąże się z transformacją nowotworową nabłonka tarczycy, a ocena ekspresji galektyny może być wiarygodną metodą różnicującą zmiany łagodne od złośliwych [16].

Antygen węglowodanowy CA50

Antygen CA50 jest jednym z antygenów węglowodanowych spokrewnionych z układem grupowym krwi Lewis. Antygeny te wchodzi w skład różnych glikoprotein uczestniczących w procesach adhezji komórkowej. Przeciwciała CA50 reaguje z sialowanym antygenem Le(a) [sLe(a)], który jest sialowaną lakto-N-tetraozą (czyli

antygenem CA50) [17]. Antygeny Le(a) i sLe(a) badano w rakach układu pokarmowego, raku pęcherza moczowego, prostaty, piersi i rakach tarczycy [18–25]. Obecność antygenów układu grupowego krwi Lewis wykazano po raz pierwszy immunohistochemicznie w rakach tarczycy w drugiej połowie lat 80., a w 1998 roku van Hoesen i wsp. [26] wykazali, że sLe(a) występuje w połowie biopłatów cienkoigłowych raków tarczycy, a Le(x) w 75% przypadków. Autorzy ci zwracali uwagę, że testy immunohistochemiczne na obecność tych markerów mogą służyć jako badania pomocnicze przy trudnych interpretacyjnie wynikach biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej (BACC).

Cel pracy

Celem pracy było określenie ekspresji wybranych molekuł adhezyjnych (kadheryny E, CD44, LGAL3 i CA50) w raku brodawkowatym tarczycy, zarówno w guzie pierwotnym, jak i w przerzutach do węzłów chłonnych oraz ocena ich przydatności diagnostycznej i prognostycznej.

Materiał i metody

Badaniem objęto grupę 47 chorych na raka brodawkowatego tarczycy. Materiał tkankowy pochodził z operacji przeprowadzonych w Instytucie Onkologii w Gliwicach w latach 1996–1998.

Badaną grupę podzielono na dwie podgrupy:

- chorzy z przerzutami do węzłów chłonnych;
- chorzy bez przerzutów do węzłów chłonnych w czasie rozpoznania.

Grupę kontrolną stanowiło 11 chorych operowanych z powodu wola guzkowego.

Do badań wykorzystano tkanki rutynowo utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie. Błoczki parafinowe cięto na skrawki o grubości 4 μ m, na szkiełka podstawowe pokryte poli-L-lizyną.

Badania przeprowadzono metodą immunohistochemiczną przy użyciu przeciwciał monoklonalnych przeciw następującym antygenom:

- galektynie-3 — NCL-GAL3 (firmy Novocastra);
- kadherynie E (CDH1) — Ecad (firmy DAKO);
- CD44 — DF1485 (firmy DAKO) — BBA10 (firmy R&D);
- sialowanemu Le(a) i sialowanej lakto-N-tetraozie — CA50 (firmy CanAg Diagnostics).

W celu uwidocznienia reakcji antygen–przeciwciało użyto systemu EnVision+/HRP Anti-Mouse (firmy Dako). Chromogenem dla peroksydazy był DAB+ (firmy Dako), który w efekcie utlenienia daje nierozpuszczalny w wodzie produkt barwy brązowej. Uzyskane reakcje immunohistochemiczne miały charakter błonowy (CDH1, CD44), cytoplazmatyczny i błonowy (CA50) lub cytoplazmatyczny i jądrowy (LGAL3).

Sposób oceny reakcji

Reakcję oceniano pod względem intensywności (I) i rozległości (R) w skali od 0 do 3.

Intensywność (I)

3 — intensywne zabarwienie widoczne pod małym powiększeniem (100 \times);

2 — intensywne zabarwienie widoczne pod średnim powiększeniem (200 \times);

1 — słabe zabarwienie widoczne dopiero pod średnim powiększeniem;

0 — brak zabarwienia.

Rozległość (R)

3 — reakcja rozległa (widoczna w każdym polu przy powiększeniu 200 \times);

2 — reakcja częściowa (widoczna w każdym polu przy powiększeniu 100 \times);

1 — reakcja ogniskowa;

0 — brak reakcji.

Po oznaczeniu intensywności i rozległości reakcji obliczono wskaźnik, który jest iloczynem obu tych wartości ($I \times R$).

Wyniki

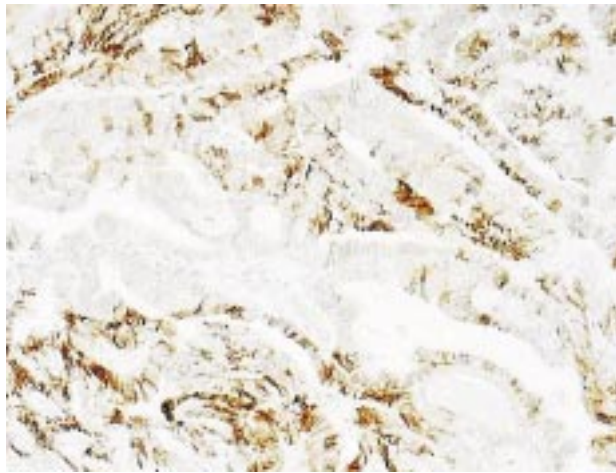
Kadheryna E (CDH1)

Półilościowa ocena ekspresji CDH1 była bardzo trudna ze względu na heterogenny charakter reakcji. Komórki o mocno zabarwionej błonie sąsiadowały z komórkami słabo zabarwionymi lub nawet o ujemnej reakcji, zarówno w guzie (ryc. 1), jak i w otoczeniu (ryc. 2). Nie zaobserwowano korelacji między występowaniem CDH1 w guzie pierwotnym a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. U chorych z przerzutami odnotowano 90% przypadków reakcji dodatniej, natomiast u chorych bez przerzutów — 92%. Ekspresja CDH1 w przerzutach była słabsza pod względem intensywności i rozległości. Zaobserwowano też, że u chorych bez przerzutów rzadziej pojawia się CDH1 w otoczeniu guza. Biorąc pod uwagę całą grupę badaną, CDH1 występowała w 91% przypadków guza pierwotnego i 84% przypadków otoczenia guza. Dodatnią reakcję oznaczono również w 63% przypadków wola niezłośliwego (tab. I).

Antygen CD44

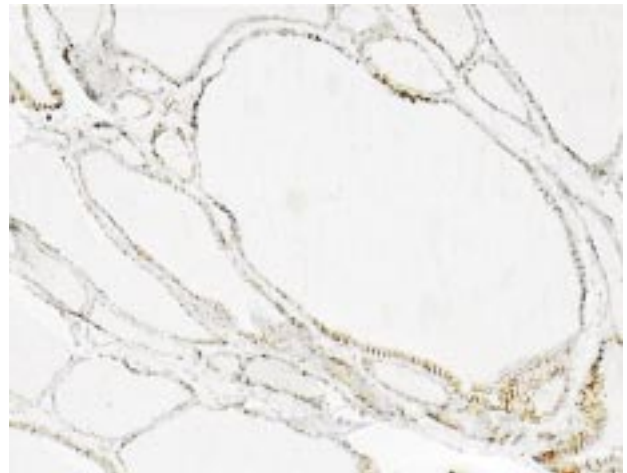
Antygen CD44 (klon DF1485) był obecny w 100% przerzutów do węzłów chłonnych, w 89% guzów pierwotnych i w 48% przypadków otoczenia guza. Zatem różnica w poziomie ekspresji CD44 w guzie i otoczeniu w porównaniu z kadherynami była większa (ryc. 3). W grupie kontrolnej antygen ten występował w 100% przypadków (tab. I).

Antygen CD44 (klon BBA10) podobnie, występował częściej w przerzutach, bo w 93% przypadków, natomiast w guzie pierwotnym występował nieco rzadziej



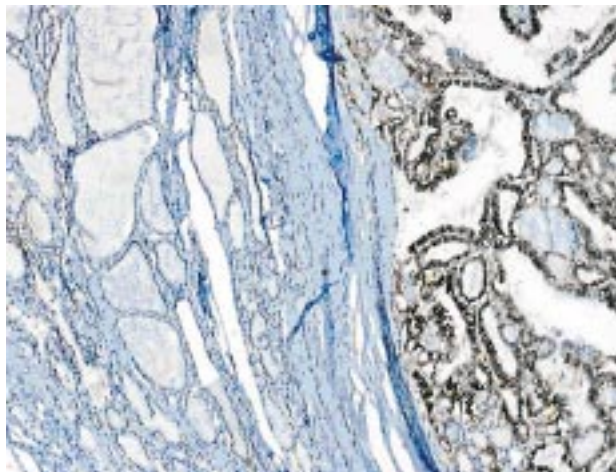
Rycina 1. Ekspresja kadheryny E w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w guzie (pow. 200 ×)

Figure 1. Cadherin E expression in Papillary Thyroid Carcinoma — reaction in tumor (100 ×)



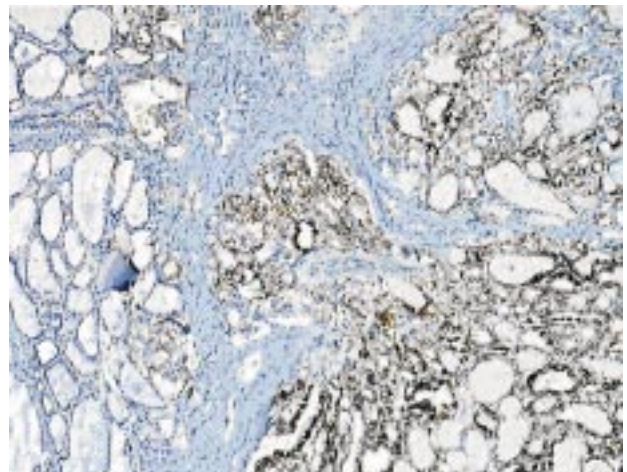
Rycina 2. Ekspresja kadheryny E w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w otoczeniu guza (pow. 100 ×)

Figure 2. Cadherin E expression in Papillary Thyroid Carcinoma — reaction in surround tissue (100 ×)



Rycina 3. Ekspresja CD44 (DF1485) w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w guzie i otoczeniu guza (pow. 100 ×)

Figure 3. CD44 (DF1485) expression in Papillary Thyroid Carcinoma — reaction in tumor and surround tissue (100 ×)



Rycina 4. Ekspresja CD44 (BBA10) w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w guzie i otoczeniu guza (pow. 100 ×)

Figure 4. CD44 (BBA10) expression in Papillary Thyroid Carcinoma — reaction in tumor and surround tissue (100 ×)

niż w reakcji z użyciem klonu DF1485 (87% przypadków, z tego 46% o maksymalnej intensywności), jednak odsetek reakcji o maksymalnej intensywności był znacznie wyższy i wyniósł 76%. Znacznie częściej, bo w 70% przypadków, obserwowano też reakcję w otoczeniu (ryc. 4) (tab. I).

Galektyna-3 (LGAL3)

Pod względem znaczenia diagnostycznego galektyna-3 była jednym z najbardziej czułych i swoistych wśród badanych markerów, o czym świadczy różnica w ekspresji między guzem a otoczeniem, odpowiednio: 91% i 5% przypadków (ryc. 5). Różnica między grupą badaną

a kontrolną jest już mniejsza, gdyż w grupie kontrolnej zaobserwowano reakcję dodatnią w 63% przypadków, przy czym w żadnym z ocenianych preparatów nie miała ona maksymalnej rozległości, natomiast w grupie raków 85% guzów pierwotnych i 100% przerzutów charakteryzowało się reakcją o maksymalnej rozległości (tab. I).

Antygen CA50

Antygen ten występował prawie tak samo często w guzie pierwotnym, jak i w przerzutach, odpowiednio w 86% i 85% przypadków (tab. I). Reakcja w raku brodawkowatym tarczycy charakteryzowała się dużą intensywnością i rozległością (ryc. 6). Jego obecność

Tabela I

Ekspresja molekuł adhezyjnych w raku brodawkowym tarczycy i grupie kontrolnej

Table I

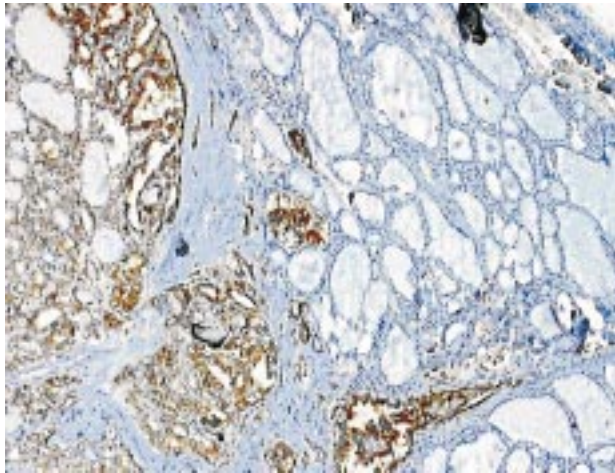
Expression of adhesive molecules in papillary thyroid carcinoma and control group

	I/R	Guz		Otoczenie		Przerzut		Kontrola	
		Liczebność	%	Liczebność	%	Liczebność	%	Liczebność	%
LGAL3	3/3	40	85,11	–	–	15	100,00	–	–
	3/2	2	4,26	1	2,78	–	–	1	9,09
	3/1	1	2,13	1	2,78	–	–	–	–
	2/3	–	–	–	–	–	–	–	–
	2/2	2	4,26	1	2,78	–	–	2	18,18
	2/1	1	2,13	2	5,56	–	–	1	9,09
	1/3	–	–	–	–	–	–	–	–
	1/2	–	–	2	5,56	–	–	1	9,09
	1/1	–	–	10	27,78	–	–	1	9,09
	0	1	2,13	19	52,78	–	–	4	36,36
CA50	3/3	6	13,64	–	–	3	21,43	–	–
	3/2	18	40,91	–	–	6	42,86	–	–
	3/1	13	29,55	–	–	3	21,43	1	9,09
	2/3	–	–	–	–	–	–	–	–
	2/2	–	–	–	–	–	–	–	–
	2/1	–	–	–	–	–	–	–	–
	1/3	–	–	–	–	–	–	–	–
	1/2	–	–	–	–	–	–	–	–
	1/1	1	2,27	1	3,45	–	–	–	–
	0	6	13,64	28	96,55	2	14,29	10	90,91
CD44 (DF1485)	3/3	19	40,43	–	–	6	40,00	10	90,91
	3/2	3	6,38	1	3,23	2	13,33	1	9,09
	3/1	–	–	–	–	–	–	–	–
	2/3	4	8,51	–	–	–	–	–	–
	2/2	6	12,77	–	–	3	20,00	–	–
	2/1	–	–	1	3,23	–	–	–	–
	1/3	–	–	–	–	–	–	–	–
	1/2	3	6,38	2	6,45	–	–	–	–
	1/1	7	14,89	11	35,48	4	26,67	–	–
	0	5	10,64	16	51,61	–	–	–	–
CD44 (BBA10)	3/3	29	61,70	–	–	10	66,67	–	–
	3/2	6	12,77	3	9,09	3	20,00	2	18,18
	3/1	1	2,13	2	6,06	–	–	–	–
	2/3	1	2,13	1	3,03	–	–	1	9,09
	2/2	2	4,26	5	15,15	–	–	–	–
	2/1	–	–	4	12,12	1	6,67	–	–
	1/3	–	–	1	3,03	–	–	–	–
	1/2	2	4,26	–	–	–	–	3	27,27
	1/1	1	2,13	7	21,21	–	–	2	18,18
	0	6	12,77	10	30,30	1	6,67	3	27,27
CDH1	3/3	7	15,22	–	–	3	20,00	–	–
	3/2	12	26,09	6	19,35	2	13,33	4	36,36
	3/1	5	10,87	1	3,23	1	6,67	–	–

cd. →

I/R	Guz		Otoczenie		Przerzut		Kontrola	
	Liczebność	%	Liczebność	%	Liczebność	%	Liczebność	%
2/3	4	8,70	8	25,81	2	13,33	–	–
2/2	4	8,70	5	16,13	–	–	–	–
2/1	4	8,70	–	–	1	6,67	2	18,18
1/3	2	4,35	1	3,23	–	–	–	–
1/2	3	6,52	3	9,68	2	13,33	–	–
1/1	1	2,17	2	6,45	3	20,00	1	9,09
0	4	8,70	5	16,13	1	6,67	4	36,36

LGAL3 — Galektyna-3; CA50 — Antygen węglowodanowy CA50; aCD44 (DF1485) — antygen CD44 badany dwoma różnymi przeciwciałami; CD44 (BBA10); CDH1 — kadheryna 1



Rycina 5. Ekspresja LGAL3 w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w guzie i otoczeniu guza (pow. 100 ×)

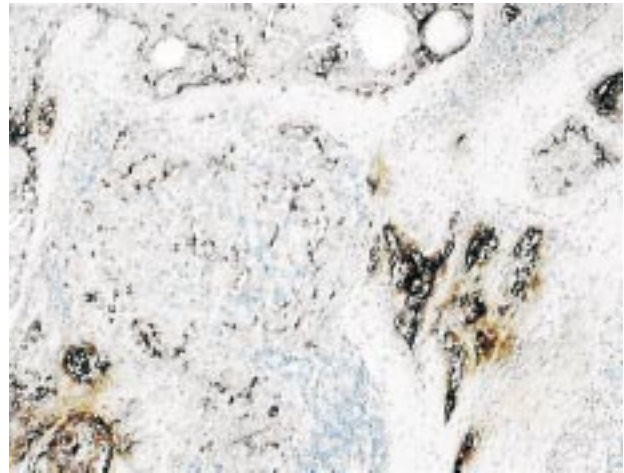
Figure 5. LGAL3 expression in Papillary Thyroid Carcinoma, reaction in tumor and surround tissue (100 ×)

w otoczeniu zaobserwowano tylko w jednym przypadku, a reakcja miała charakter ogniskowy. Podobnie w grupie kontrolnej odnotowano jeden przypadek dodatni z ogniskową ekspresją.

Dyskusja

Badane białka adhezyjne można analizować pod różnym względem, zarówno w aspekcie ich znaczenia dla biologii raka, jak i informacji o znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym, które wnosi ich oznaczenie. W niniejszej pracy główny nacisk położono na aspekt diagnostyczny, chociaż z porównania częstości ekspresji markera w guzach, którym towarzyszyły przerzuty do węzłów chłonnych, z guzami o mniejszym stopniu zaawansowania można wyciągać pewne wnioski o potencjalnym znaczeniu prognostycznym danego markera.

Galektyna-3 jest znanym i często stosowanym w diagnostyce markerem raka tarczycy, choć kontro-



Rycina 6. Ekspresja CA50 w raku brodawkowatym tarczycy — reakcja w guzie (pow. 100 ×)

Figure 6. CA50 expression in Papillary Thyroid Carcinoma — reaction in tumor (100 ×)

wersyjnym. Świadczy o tym duża liczba prac i skrajnie różne poglądy na temat jej przydatności oznaczania. Dużym uproszczeniem byłoby stwierdzenie, że im starsze prace, tym bardziej optymistyczne doniesienia, gdyż dyskusja wciąż trwa i liczba zwolenników zarówno jednego, jak i drugiego poglądu nie maleje. W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy galektyna-3 okazała się niezwykle wartościowym markerem raka brodawkowatego tarczycy. Prawie wszystkie guzy pierwotne charakteryzowały się dodatnią reakcją na galektynę-3 (46 z 47), zarówno w grupie chorych z przerzutami do węzłów chłonnych, jak i bez przerzutów. W zdecydowanej większości przypadków reakcja ta była intensywna i rozległa. Wśród badanych markerów galektyna-3 okazała się jednym z najbardziej swoistych i czułych pod względem znaczenia diagnostycznego, o czym świadczy różnica w intensywności i rozległości reakcji między guzem a otoczeniem. Dowodzi tego również różnica między badaną grupą raków brodawkowatych, w której najwyższy wskaźnik oznaczono w 85,1%

przypadków, a grupą kontrolną łagodnych rozrostów brodawkowatych, w której reakcja była słabsza i w żadnym przypadku nie oznaczono najwyższego wskaźnika.

Już w 1998 roku Orlandi i wsp. [27], badając materiał otrzymany z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej, po porównaniu z materiałem histologicznym, uznali galektynę-3 za wiarygodny, tani i łatwy w oznaczaniu marker przydatny w przedoperacyjnej diagnostyce guzów tarczycy, a szczególnie raka brodawkowatego. Podobnie w 1999 roku Inohara i wsp. [28] dowodzą, że oznaczanie galektyny-3 zwiększa dokładność diagnostyki różnicowej zmian łagodnych i złośliwych tarczycy. W 2003 roku Giannini i wsp. [29], porównując przydatność różnych metod oznaczania galektyny-3, otrzymali pełną zgodność między wynikami uzyskanymi w metodzie immunocytochemicznej i immunohistochemicznej, co pozwoliło im na uznanie tego markera za wartościowy w przedoperacyjnej diagnostyce cytologicznej guzów tarczycy. Pisani i wsp. [30], autorzy pracy na temat diagnostyki cytologicznej utajonego raka brodawkowatego, stanowczo stwierdzają, że oznaczanie galektyny-3 powinno być częścią procedury wspomagającej klasyczną ocenę cytologiczną w przypadkach niejednoznacznych diagnostycznie. Oznaczanie galektyny-3 było pomocne w przedoperacyjnej diagnostyce minimalnie inwazyjnego raka pęcherzykowego [14]. Należy podkreślić, że przydatność diagnostyczna galektyny-3 zależy od typu raka. O ile w raku brodawkowatym ekspresja galektyny-3 niemal swoiście pojawia się w komórkach raka, to w różnicowaniu guzów pęcherzykowych wartość diagnostyczna metody jest zdecydowanie niższa.

Część autorów zaleca stosowanie oznaczania galektyny-3 jako wskaźnika o wysokiej swoistości, bardzo pomocnego przy różnicowaniu trudnych diagnostycznie przypadków gruczolaka od raka pęcherzykowego, a także pęcherzykowej postaci raka brodawkowatego [16, 27]. Z kolei w innych pracach dominuje pogląd, że wartość diagnostyczna galektyny-3 jako markera jest niska, gdyż występuje ona zarówno w zmianach łagodnych, jak i złośliwych [31]. Analizowano również wpływ galektyny-3 na inwazyjność raka i zaobserwowano korelację między zawartością galektyny-3 w guzie pierwotnym i obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Guzy pierwotne, które charakteryzowały się wyższą ekspresją galektyny-3, częściej tworzyły przerzuty. Ujawniono, że utkanie przerzutu zawierało więcej galektyny niż guz pierwotny [32]. Badane przez autorów niniejszej pracy przypadki raka brodawkowatego tarczycy odznaczały się bardzo wysoką ekspresją galektyny-3 i to zarówno w grupie z przerzutami do węzłów chłonnych, jak i bez przerzutów. Nie zaobserwowano znacząco wyższej ekspresji galektyny-3 w przerzutach nowotworowych w stosunku do guza pierwotnego.

Otrzymane przez autorów wyniki wydają się wskazywać, że galektyna-3 jest przydatnym markerem w diagnostyce raka brodawkowatego tarczycy. Na potwierdzenie tej tezy można przytoczyć wyniki Bartolazziego i wsp. [33], którzy przeprowadzili badania wielośrodkowe nad galektyny-3 i CD44v6 w ponad 1000 przypadków guzów tarczycy. W 75 przypadkach prawidłowej tkanki tarczycy odnotowano brak ekspresji obu markerów. Na 287 przypadków zmian łagodnych w 280 nie wykazano reakcji na galektynę-3, natomiast zaobserwowano wzrost ekspresji CD44v6 w zmianach proliferacyjnych łagodnych. Wśród 311 przypadków zmian złośliwych o różnym typie histologicznym i różnym stopniu zróżnicowania (z wyjątkiem raka rdzenia) 293 przypadki (94%) dały dodatnią reakcję na galektynę-3, a 253 przypadki (81%) wykazały dodatnią reakcję na CD44v6. Ponadto autorzy zaobserwowali, że w grupie minimalnie inwazyjnego raka pęcherzykowego komórki wykazujące obecność galektyny-3 znajdowano głównie w obszarach ogniskowej inwazji torebki. Zatem można przypuszczać, że podejrzane gruczolaki pęcherzykowe z dodatnią reakcją na galektynę-3 są prawdopodobnie wczesnymi rakami tarczycy z molekularnymi oznakami transformacji. Na wartość galektyny-3 i CD44v6 jako markerów różnicujących w materiale cytologicznym raka pęcherzykowego od gruczolaka pęcherzykowego zwracają również uwagę Maruta i wsp. [34], chociaż jednocześnie zauważają oni brak korelacji między tymi markerami i naciekaniem torebki oraz naczyń w materiale histologicznym, rozmiarem guza i pojawieniem się przerzutów.

Następnym badanym markerem był antygen węglowodanowy CA50. Wielu autorów sugeruje, że obecność antygenów spokrewnionych z układami grupowymi krwi (w tym CA50) w tkance nowotworowej stanowi negatywny czynnik prognostyczny. W raku żołądka ekspresja sLe(a) ma negatywne znaczenie rokownicze, a w zaawansowanej jego postaci koreluje z przerzutami do otrzewnej [35]. Inni dowodzą pozytywnej roli tych markerów, i tak Lipponen i Eskelinen, badając ekspresję CA50 w raku przejściowokomórkowym pęcherza moczowego, zaobserwowali, że progresja ściśle wiązała się z negatywnym odczynem na CA50 [21]. W niniejszej analizie ekspresji CA50 w raku brodawkowatym tarczycy zaznaczyła się przede wszystkim wartość diagnostyczna tego markera, na którą wskazuje fakt częstej jego obecności w raku brodawkowatym tarczycy, przy równoczesnym rzadkim występowaniu w zmianach łagodnych. Tylko w jednym przypadku obserwowano intensywną, ale ogniskową reakcję i praktycznie brak ekspresji w otoczeniu guza. Można więc wnioskować, że przeciwciała przeciw temu antygenowi mogłoby znaleźć szersze niż dotąd zastosowanie diagnostyczne. Jednocześnie należy wyjaśnić,

że dla tego antygeny nie ma odpowiednika w badaniach na poziomie RNA, gdyż jego ekspresja jest nie tyle bezpośrednio zależna od aktywacji transkrypcji konkretnego genu, co ma związek z aktywnością enzymów wbudowujących określone łańcuchy węglowodanowe w różne glikoproteiny powierzchniowe.

W opracowaniach dotyczących ekspresji CD44 najczęściej uwagi poświęca się CD44v6. W badaniach nad obecnością CD44v6 w nowotworach płuc zaobserwowano pełną korelację pomiędzy jego ekspresją w guzie pierwotnym i w przerzutach. Nie stwierdzono jednak korelacji między ekspresją tego markera a zaawansowaniem klinicznym [36]. Przeciwnie, Bankfalvi i wsp. [37] w badaniach nad ekspresją CD44 w raku piersi odnotowali związek między utratą CD44v6 a znacznie bardziej zaawansowanym stanem klinicznym. Silna reakcja na CD44v6 korelowała również z dłuższym okresem przeżycia.

Z kolei Yu i Stamenkovic opisują interakcje CD44 i metaloproteinaz wpływające na wzrost inwazyjności miejscowej i rozsiewu nowotworów [11]. W materiale autorów prezentowanej pracy antygen CD44 występował częściej w przerzutach niż w guzach pierwotnych. Ponadto ekspresja CD44 w samych przerzutach nowotworowych była większa niż w guzach pierwotnych. Dotyczyło to zarówno klonu DF1485, jak i BBA10, co może sugerować pewne znaczenie prognostyczne tego markera. Pod względem diagnostycznym klon BBA10 okazał się bardziej czułym, lecz mniej swoistym od DF1485. Zastanawia więc fakt, że w grupie kontrolnej ujawniono słabszą reakcję niż z DF1485.

Kolejnym badanym markerem była kadheryna E (CDH1). Chociaż w badaniach tej kadheryny uzyskano różne wyniki, niektórzy autorzy nazywają wręcz tę transbłonową glikoproteinę supresorem inwazji i przerzutowania w rakach tarczycy [38]. Inni jednak odnotowują brak korelacji między występowaniem kadheryny E w guzie i przerzutami czy innymi cechami klinicznymi [39]. Biorąc pod uwagę fakt, że CDH1 występuje w prawidłowych komórkach nabłonkowych, a obniżenie jej ekspresji może być interpretowane jako sygnał odróżnicowania komórki, autorzy badali również jej wartość diagnostyczną w raku brodawkowatym tarczycy. Z badań autorów niniejszej pracy wynika, że ocena reakcji jest trudna, ze względu na jej heterogenność. Komórki o mocno zabarwionej błonie sąsiadowały z komórkami słabo zabarwionymi lub nawet o ujemnej reakcji. O takim rozkładzie ekspresji informowali wcześniej inni autorzy [40]. Heterogenność ta występowała zarówno w guzie, jak i w jego otoczeniu, które stanowiło kontrolę wewnętrzną.

W pierwotnym raku jelita grubego zaobserwowano, że prawie połowa przerzutów do węzłów chłonnych wykazała wyższą ekspresję kadheryny E niż guzy

pierwotne [9]. W niniejszych badaniach przerzuty do węzłów chłonnych charakteryzowały się słabszą reakcją na CDH1 niż guzy pierwotne, zarówno pod względem intensywności, jak i rozległości.

Wnioski

1. Spośród badanych markerów (LGAL3, CA50, CD44, CDH1) największą wartość diagnostyczną w raku brodawkowatym tarczycy wykazał antygen CA50 i galektyna-3.
2. Ekspresja CD44 (DF1485) w guzie pierwotnym jest znacznie silniejsza niż w otoczeniu, jednak jego wartość diagnostyczna jest niepewna, gdyż występuje on często w zmianach łagodnych tarczycy. Zastosowanie przeciwciała BBA10 zwiększa czułość metody, ale zmniejsza jej swoistość.
3. Częste występowanie kadheryny E w komórkach raka brodawkowatego tarczycy, otoczeniu guza i zmianach łagodnych tarczycy nie pozwala na jej zastosowanie diagnostyczne.

Piśmiennictwo

1. Yap A, Stevenson B, Waters M i wsp. Vinculin localization and actin stress fibers differ in thyroid cells organized as monolayers or follicles. *Cell Motil Cytoskeleton* 1995; 32: 318–331.
2. Dahlman T, Grimelius L, Wallin G i wsp. Integrins in thyroid tissue: upregulation of $\alpha 2\beta 1$ in anaplastic thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 104–112.
3. Żeromski J, Ławniczak M, Galbas K i wsp. Expression of CD56/ N-CAM antigen and some other adhesion molecules in various human endocrine glands. *Folia Histochem Cytobiol* 1998; 36: 119–125.
4. Cerrato A, Fulciniti F, Avallone A i wsp. Beta- and gamma-catenin expression in thyroid carcinomas. *J Pathol* 1998; 185: 267–272.
5. Shih-Horn Huang, Jiahn-Chun Wu, King-Jen Chang i wsp. Distribution of the cadherin-catenin complex in normal human thyroid epithelium and thyroid carcinoma cell line. *J Cell Biochem* 1998; 70: 330–337.
6. Ropponen K, Eskelinen M, Lipponen P i wsp. Reduced expression of α catenin is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 1999; 52: 10–16.
7. Kooy A, Tank B, Jong A i wsp. Expression of E-cadherin, α - & β -catenin, and CD44v6 and the subcellular localization of E-cadherin and CD44v6 in normal epidermis and basal cell carcinoma. *Human Pathology* 1999; 30: 1328–1335.
8. Popov Z, Medina S, Lefrere-Belda i wsp. Low E-cadherin expression in bladder cancer at the transcriptional and protein level provides prognostic information. *Br J Cancer* 2000; 83: 209–214.
9. Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 2001; 77: 201–207.
10. Soukka T, Salmi M, Joensuu H i wsp. Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells. *Cancer Research* 1997; 57: 2281–2289.
11. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes & Development* 1999; 13: 35–48.

12. Bourguignon L, Gunja-Smith Z, Iida N i wsp. CD44v3,8–10 is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase (MMP-9) association in metastatic breast cancer cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 206–215.
13. Bernet V, Anderson J, Vaishnav Y i wsp. Determination of galectin-3 messenger ribonucleic acid overexpression in papillary thyroid cancer by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4792–4796.
14. Saggiorato E, Cappia S, De Giuli P i wsp. Galectin-3 is a presurgical immunocytochemical marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5152–5158.
15. Savin S, Cvejić D, Janković M. Expression of galectin-1 and galectin-3 in human fetal thyroid gland. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 479–483.
16. Xu XC, el-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1995; 147: 815–822.
17. Johansson C, Nilsson O, Baeckstrom i wsp. Novel epitopes of the CA50-carrying antigen: chemical and immunochemical studies. *Tumor Biology* 1991; 12: 159–170.
18. Kobayashi K, Sakamoto J, Tsuyoshi K i wsp. Lewis blood group-related antigen expression in normal gastric epithelium, intestinal metaplasia, gastric adenoma, and gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 919–924.
19. Xiao-Feng Sun, Hong Zhang. Expression of tumor-related antigens Lewis-a, Lewis-b, X, Y, SPan-1 and CEA in relation to differentiation and prognosis in rectal adenocarcinomas. *APMIS* 1996; 104: 784–788.
20. Murata K, Egami H, Shibata Y i wsp. Expression of blood group-related antigens, ABH, Lewis-a, Lewis-b, Lewis-x, Lewis-y, CA19-9, CSLEX1 in early cancer, intestinal metaplasia, and uninvolved mucosa of the stomach. *Am J Clin Pathol* 1992; 98: 67–75.
21. Lipponen P, Eskelinen M. Expression of C-50 antigen as a prognostic variable in transitional cell bladder tumors. *Br J Urol* 1993; 71: 192–198.
22. Idikio H, Manickavel V. Correlation of blood group antigen expression and oncogene-related proteins in malignant prostatic tissues. *Path Res Pract* 1991; 187: 189–197.
23. Idikio HA, Manickavel V. A, B, H, and Lewis-a and Lewis-b blood group antigens in human breast cancer: correlation with steroid hormone receptor and disease status. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993; 119: 486–492.
24. Vierbuchen M, Schroder S, Larena A, Uhlenbruck G, Fischer R. Native and sialic acid masked Lewis(a) antigen reactivity in medullary thyroid carcinoma. Distinct tumour-associated and prognostic relevant antigens. *Virchows Arch* 1994; 424: 205–211.
25. Vierbuchen M, Larena A, Schroder S i wsp. Blood group antigen expression in medullary carcinoma of the thyroid. An immunohistochemical study on the occurrence of type 1 chain-derived antigens. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1992; 62: 79–88.
26. van Hoeven K, Kovatich A, Miettinen M. Immunocytochemical evaluation of HBME-1, CA 19-9, and CD15 (Leu-M1) in fine-needle aspirates of thyroid nodules. *Diagn Cytopathol* 1998; 18: 93–97.
27. Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G i wsp. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 3015–3020.
28. Inohara H, Honjo Y, Yoshii T i wsp. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 1999; 85: 2475–2484.
29. Giannini R, Faviana P, Cavinato T i wsp. Galectin-3 and oncofetal-fibronectin expression in thyroid neoplasia as assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction and immunocytochemistry in cytologic and pathologic specimens. *Thyroid* 2003; 13: 765–770.
30. Pisani T, Vecchione A, Giovagnoli M. Galectin-3 immunodetection may improve cytological diagnosis of occult papillary thyroid carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 1111–1112.
31. Mehrotra P, Okpokam A, Bouhaidar R i wsp. Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology* 2004; 45: 493–500.
32. Kawachi K, Matsushita Y, Yonezawa S i wsp. Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Human Pathol* 2000; 31: 428–433.
33. Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M i wsp. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001; 357: 1644–1650.
34. Maruta J, Hashimoto H, Yamashita H i wsp. Immunostaining of galectin-3 and CD44v6 using fine-needle aspiration for distinguishing follicular carcinoma from adenoma. *Diagn Cytopathol* 2004; 31: 392–396.
35. Ikeda Y, Mori M, Kajiyama K i wsp. Immunohistochemical expression of sialyl Tn, sialyl Lewis a, sialyl Lewis a-b-, and sialyl Lewis x in primary tumor and metastatic lymph nodes in human gastric cancer. *J Surg Oncol* 1996; 62: 171–176.
36. Fasano M, Sabatini M, Wiczorek R i wsp. CD44 and its v6 spliced variant in lung tumors. A role in histogenesis. *Cancer* 1997; 80: 34–41.
37. Bankfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann i wsp. Gains and losses of CD44 expression during breast carcinogenesis and tumor progression. *Histopathology* 1998; 33: 107–116.
38. Wasielewski R, Rhein A, Werner M i wsp. Immunohistochemical detection of E-cadherin in differentiated thyroid carcinomas correlates with clinical outcome. *Cancer Res* 1997; 57: 2501–2507.
39. Kapran Y, Ozbey N, Molvalilar S i wsp. Immunohistochemical detection of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in papillary thyroid carcinoma. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 578–585.
40. Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas i wsp. Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol* 1998; 185: 71–78.