

ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА МАТРИКС МЕТАЛОПРОТЕИНАЗЕ Ђ 2 (ММР-2) У ТКИВУ МЕДУЛАРНОГ ТИРЕО- ИДНОГ КАРЦИНОМА У КОРЕЛАЦИЈИ СА КЛИНИЧКО-ПАТОЛОШКИМ ПАРАМЕТРИМА

Дубравка Цвејић, Светлана Савин, Иван Пауновић, Светислав Татић,
Марија Хавелка

УВОД

Способност малигну хелија да протеолитички разладу компоненте екстрацелуларног матрикса неопходна је у свим фазама туморогенезе, укључујући организацију примарног тумора, туморску прогресију и последњу фазу туморске прогресије, метастатски процес (1-3).

Фамилија матрикс металопротеиназа (ММР) представља групу структурно сродних протеолитичких ензима, ендонуклеаза, који се одликују способношћу деградације различитих протеинских компоненти екстрацелуларног матрикса. ММР фамилија протеолитичких ензима укључује до сада идентификованих 18 чланова, класификованих према специфичности за супстрат (kolagen, gelatin, laminin, fibronektin, proteoglikani).

Заједничке особине свих чланова ММР фамилије су следеће: структурна хомологија, каталитички механизам зависан од присуства цинковог јона, секреција у облику проактивног ензима (зимогена) и регулација ендегеним инхибиторима (4-6).

Протеолитички ензими ММР фамилије имају вадну улогу у нормалним физиолошким процесима (организација ткива током феталног развића, регенерација оштећеног ткива).

У патолошким процесима, као што је неопластична трансформација и раст туморског ткива, мењају се нивои продукције протеолитичких ензима и њихових ендегених инхибитора.

Матрикс металопротеиназа-2 (ММР-2, gelatinaza A), члан фамилије ММР, је протеолитички ензим молекулске масе 72 kDa, способан да деградира колаген IV и gelatin (7). Сматра се да активност овог ензима у протеолитичкој деградацији екстрацелуларног матрикса има вадну улогу у малигним процесима.

Значајна продукција ензима ММР-2 западена је у различитим хуманим туморима, укључујући карциноме дојке (8), колоректума (9), панкреаса (10), сквамозне карциноме главе и врата (11) и друге малигне туморе.

Досадашња, малобројна истрадивања продукције протеолитичких ензима у малигном ткиву штитасте длезде указала су да тиреоидни карциноми продукују ензиме ММР-1 и ММР-2, и да су ови ензими локализовани у туморским хелијама и /или у фибробластима туморског ткива (12-16). Ове студије су се углавном односиле на тиреоидне туморе који воде порекло од фоликуларног епитела штитасте длезде (папиларни, фоликуларни и анапластични карцином).

Медуларни тиреоидни карцином (МТС) води порекло од парафоликуларних тиреоидних хелија, које продукују калцитонин (С хелије). МТС, који чини 5-10% свих тиреоидних карцинома, одликује се посебним биолошким и генетским карактеристикама, а прогноза овог типа карцинома је генерално лошија од прогнозе добро диференцираних тиреоидних карцинома, а боља од прогнозе анапластичног тиреоидног карцинома (17-20).

У овом раду изучавали смо имунохистохемијском методом експресију протеолитичког ензима ММР-2 у ткиву медуларног тиреоидног карцинома у корелацији са клиничко-патолошким параметрима.

Материјал и методе

Тиреоидно ткиво

Анализирана су 22 случаја медуларног тиреоидног карцинома добијена из архивског материјала (ткиво фиксирано у 10% формалину и укалупљено у парафин) Института за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма, Клинички центар Србије, Београд.

Селекција материјала се заснивала на претходној дијагнози утврђеној рутинском хистопатолошком анализом (21) и позитивном имунохистохемијском бојењу на калцитонин.

Клиничко-патолошки параметри, који су укључивали пол, године, стадијум тумора према TNM класификацији (22), прикупљени су у време хируршке интервенције.

Имунохистохемијско бојење

Примењена је ABC (avidin-biotin комплекс) метода имунохистохемијског бојења (23) и реагенс произвођача Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

Одсечци ткива, дебљине 4-6 μm , су након депарафинације и рехидратације, инкубирани са 0,3% H_2O_2 у метанолу (блокирање активности ендogene пероксидазе), а затим са неимуним серумом у трајању од 20 минута (блокирање неспецифичног везивања). Након тога, одсечци ткива су инкубирани са примарним моноклонским антителом на ензим MMP-2 (клон 42-5D11, Oncogene Research Products, Calbiochem, USA) у разблађењу 1/100, преко ноћи, на 4°C. Инкубацију са секундарним антителима (anti-мишији biotin-IgG), у разблађењу 1/200 и трајању од 30 минута, пратила је инкубација са ABC (streptavidin-biotin-peroksidaza) реагенсом, у трајању од 30 минута. Између сваке инкубације, одсечци ткива су три пута испрани фосфатним пуфером (PBS). Имунохистохемијска реакција је визуализирана (развијање боје) применом готовог раствора diaminobenzidin terahidrohlorida (DAB), према упутству произвођача (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

Након бојења hematoksilinom, одсечци ткива су анализирани Reichert-Jung микроскопом, снабденим аутоматским фото-камера системом.

Негативну контролу, за сваки анализирани случај МТС, представљала је замена моноклонског антитела на MMP-2 радним пуфером, што је резултовало одсуством позитивне реакције и указало на специфичност реакције антиген-антитело.

Резултати

Резултати имунохистохемијске анализе експресије ензима MMP-2 у ткиву медуларног тиреоидног карцинома у поређењу са клиничко-патолошким параметрима прикупљеним у време хируршке интервенције, приказани су у Табели 1.

Анализа хистолошких препарата светлосном микроскопијом утврдила је да 13 од 22 анализирани случаја МТС имају искључиво полигоналне ћелије са округлим или овалним нуклеусима, док су у девет случајева МТС нађене веће или мање зоне са ћелијама вретенастог облика. У највећем броју случајева (18/22), утврђено је присуство амилоида у различитим количинама. У 11 случајева МТС метастазе у регионалним лимфним чворовима (LNM) биле су присутне у време извођења хируршке интервенције (pN1).

Резултати анализе експресије ензима MMP-2 у ткиву медуларног тиреоидног карцинома показали су позитивну имунохистохемијску реакцију у свим испитаним случајевима. Дифузно цитоплазматско бојење умереног (+) до јаког (++) интензитета, у великом делу туморске масе, нађено је у 19/22 случаја, а слабо или фокално бојење (+/-) у 3/22 случаја МТС. Осим у туморским ћелијама, позитивно имунохистохемијско бојење нађено је и у стромалном (везивном) ткиву, унутар туморске масе, као и у капсули између туморског ткива и околног нормалног ткива. Имунохистохемијски позитивне ћелије у строми биле су вретенастог облика (фибробласти). Ендотелне ћелије зидова крвних судова унутар туморског ткива биле су такође имунореактивне. Унутрашњост туморске масе показивала је сличну имунореактивност као и периферија. Епителне ћелије нормалних фоликула суседних туморској маси нису показивале имунореактивност.

Упоредно анализирање експресије MMP-2 и хистопатолошког изгледа туморског ткива

или стадијума тумора, показује да нема уочљиве корелације између имунохистохемијских налаза и наведених параметара. Узнапредовали стадијум МТС (са LNM у време хируршке интервенције, pN1, 11 случајева) показао је сличне резултате имунохистохемијског бојења на ензим MMP-2 као случајеви без LNM, pN0 (Табела 1).

Дискусија

У овој имунохистохемијској студији анализирали смо експресију ензима матрикс металопротеиназе, MMP-2, у серији од 22 случаја медуларног тиреоидног карцинома у корелацији са клиничко-патолошким параметрима.

Резултати имунохистохемијског бојења уз примену моноклонског антитета на протеолитички ензим MMP-2 показали су значајну имунореактивност у малигним ћелијама већине анализираних медуларних тиреоидних карцинома, што указује на капацитет ових ћелија да продукују велике количине овог ензима.

Досадашња истраживања матрикс металопротеиназа у тиреоидним туморима су веома оскудна. На значај MMP-2 је указано у ранијим радовима у којима су коришћене имунохистохемијске методе (13), *in situ* хибридизација (14) и *gelatin-zimografija* (15,16). С обзиром да у неким од ових радова MMP-2 није детектована у туморским ћелијама, него само у строми, развила се дискусија о томе да ли саме канцерске ћелије продукују матрикс металопротеиназе или канцерске ћелије стимулишу паракриним механизмима околне везивне (стромалне) ћелије на продукцију матрикс металопротеиназа.

У овој студији, имунохистохемијским бојењем на ензим MMP-2, утврђена је позитивност и ћелија карцинома, као и стромалних ћелија. Главна продукција ензима MMP-2 је детектована у самим малигним ћелијама, модда због ниске целуларности фибробласта у поређењу са целуларношћу туморских ћелија.

Међутим, анализа случајева МТС испитаних у овом раду показује да експресија MMP-2 нема очигледну везу са клиничко-патолошким параметрима (хистопатолошки изглед тумора, величина тумора или присуство регионалних лимфних метастаза).

Дакле, имунохистохемијско бојење на MMP-2 изгледа да нема прогностички значај за медуларни тиреоидни карцином.

Могућа су одређена објашњења за овакав налаз. Једно од могућих објашњења је да је висока продукција ензима MMP-2 веома рани догађај у развоју МТС. Такође, чланови MMP фамилије протеолитичких ензима имају различите супstrate и вероватно имају специфичне улоге у сваком поједином кораку туморогенезе различитих хуманих тумора. Према томе, могуће је да је MMP-2 само један од ензима који доприносе прогресији ове врсте тумора. Такође, као и остали чланови MMP фамилије, и латентни MMP-2 проензим је регулисан протеолитичком активацијом (24) и интеракцијом са ткивним инхибиторима матрикс металопротеиназа (TIMP), њиховим специфичним инхибиторима (25). Поремећена равнотеда између активности MMP и њихових инхибитора могла би бити одговорна за туморску прогресију. Дакле, могуће је да би подаци о равнотеди између протеолитичких ензима и њихових инхибитора били много информативнији за прогнозу прогресије тумора.

ЗАКЉУЧАК

Резултати ове студије показали су да је значајна продукција ензима MMP-2 карактеристика малигног фенотипа парафоликуларне тиреоидне ћелије, што упућује на потенцијалну улогу овог протеолитичког ензима у туморогенези *in vivo*.

Одсуство корелације између резултата имунохистохемијског бојења и клиничко-патолошких параметара (хистопатолошки изглед ткива, величина тумора, присуство регионалних лимфних метастаза) указује да имунохистохемијско бојење на MMP-2 нема прогностички значај за медуларне тиреоидне карциноме.

Могуће је да би у прогностичком смислу били кориснији подаци о поремећају у балансу између синтезе протеолитичких ензима и синтезе њихових ендогених инхибитора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liotta L. A., Rao C. N., Barsky S. H.: Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.* 1983,49:636-649.
2. Duffy M. J.: The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis.* 1992,10:145-149.
3. Aznavoorian S., Murphy A. N.: Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993,71:1368-1383.
4. Birkeda-Hansen H., Moore W. G. I., Bodden M. K.: Matrix metalloproteinases. A review. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 1993,42:197-250.
5. Murphy G.: Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Acta Orthop. Scand. Suppl.* 1995,266:55-60.
6. Toi M., Ishigaki S., Tominaga T.: Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998,52:113-124.
7. Tryggvason K., Hoyhtya M., Pyke C.: Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 1993,24:209-218.
8. Basset P., Bellocq J. P., Wolf C. et al.: A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990,348:699-704.
9. Emmert-Buck M. R., Rooth M. J., Zhung Z.: Increased gelatinases A and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples. *Am. J. Pathol.* 1994,145:1285-1290.
10. Ellenrieder V., Alber B., Lacher U. et al.: Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int. J. Cancer.* 2000,85:14-20.
11. Muller D., Breathnach R., Engelmann A.: Expression of collagenase-related metalloproteinase gene in human lung or head and neck tumors. *Int. J. Cancer.* 1991,48:550-556.
12. Kameyama K.: Expression of MMP-1 in the capsule of thyroid cancer. Relationship with invasiveness. *Pathol. Res. Pract.* 1996,192:20-26.
13. Campo E., Merino M. J., Liotta L., Neumann R., Stetler-Stevenson W.: Distribution of the 72-kd type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue. *Hum. Pathol.* 1992,23:1395-1401.
14. Zedenius J., Stahle-Backdahl M., Enberg U. et al.: Stromal fibroblasts adjacent to invasive thyroid tumors: expression of gelatinase A but not stromelysin 3 mRNA. *World. J. Surg.* 1996,20:101-106.
15. Demeure M. J., Damsky C. H., Elfman F., Goretzki P. E., Wong M. G., Clark O. H.: Invasion by cultured human follicular thyroid cancer correlates with increased beta-1 integrins and production of proteases. *World J. Surg.* 1992,16:770-775.
16. Nakamura H., Ueno H., Yamashita K. et al.: Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane type I matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 1999,59:467-473.
17. Murray D.: The thyroid gland. In: *Functional Endocrine Pathology.* Kovacs K and Asa SI eds. Boston: Blackwell Scientific, 1991,293-374.
18. Rosai J.: Thyroid gland. In *Ackermans Surgical Pathology*, 8th ed. St. Louis: Mosby, 1996; 493-567.
19. Moley J.: Medullary thyroid cancer. *Surg. Clin. NA* 1995; 75; 405-420.
20. Ball D. W., Baylin S. B., deBustros A.: Medullary thyroid carcinoma. In *Werner and Ingbar's The Thyroid*, 7th ed. Braverman L. E. and Utiger R. D., eds. Philadelphia – New York: Lippincott – Raven, 1996; 946-961.
21. Hedinger C., Williams E. D., Sobin L. H.: Histological typing of thyroid tumours, 2nd ed. In *International Histological Classification of Tumours.* World Health Organization. Geneva: Springer – Verlag, 1988.
22. Hermanek P., Sobin L. H., eds.: *TNM Classification of Malignant Tumours*, 4th ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1987.
23. Hsu R. M., Raine L., Fanger H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 1981; 29; 577-580.
24. Strongin A. Y., Collier I., Bannikov G., Marmer Bl., Grant G. A., Goldberg G. I.: Mechanisms of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. *J. Biol. Chem.* 1995,270:5331-5338.
25. Kinoshita T., Sato H., Takino T., Itoh M., Akizawa T., Seiki M.: Processing of a precursor of 72-kDa type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Can-*

cer. Res. 1996,56:2535-25.