



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА РЕГУЛАТОРА РАСТА У КОЖНИМ НЕОПРОЛИФЕРАЦИЈАМА МЕЛАНОЦИТНЕ И КЕРАТИНОЦИТНЕ ХИСТОГЕНЕЗЕ

Кључне речи :

кожа, пренеопластичне лезије, тумори, гени регулатори раста, клиничкопатолошки статус.

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Све већа учесталост тумора коже чини да они постају важан онколошки проблем, тим пре што је стопа смртности од меланома још увек висока, а истовремено кератиноцитни тумори претстављају значајан здравствени проблем будући да чине приближно 90% свих малигнитета коже, а њихова дуготрајна прогноза је лоша јер је десетогодишње преживљавање мање од 10%. Извештаји из литературе указују да су, ћелијски раст, степен ангиогенезе и губитак ћелијске адхезије, важни параметри који детерминишу туморску прогнозу. Међу регулаторима раста и ангиогенезе значајну улогу у ћелијској прогресији имају циклини, супресори p27, p57, регулатори ангиогенезе ендоглини и VEGF и адхезиони молекули Е-кадхерини за које се сматра да функционишу као супресори туморске инвазије и метастазирања. Испитивање експресије наведених онкогена у преканцерозним лезијама и туморима коже пореклом из кератиноцита и меланоцита би омогућило да се препознају пацијента са ниским и/или високим ризиком за развој агресивне болести, чиме би се прецизније дефинисала терапија инхибиторима ангиогенезе и одредиле минималне хируршке маргине.

Циљ истраживања:

1. Испитивање преканцерозних лезија и тумора кератиноцитне и меланоцитне хистогенезе у односу на пол, старост, занимање пацијената и локализацију промене
2. Хистопатолошка диференцијација кератиноцитних неопролиферација у односу на биолошко понашање и хистопатолошки градус.
3. Хистопатолошка диференцијација меланоцитних неопролиферација у односу на биолошко понашање и хистопатолошки градус.
4. Имунохистохемијска диференцијација меланоцитних од кератиноцитних пролиферација
5. Имунохистохемијско испитивање експресије Cyclin E, Cyclin D, p27, p57, VEGF-a и CD105 у бенигним, преканцерозним и малигним лезијама коже кератиноцитног и меланоцитног порекла.
6. Имунохистохемијско испитивање експресије Е-кадхеринских адхезионих молекула у кератиноцитним и меланоцитним пролиферацијама.
7. Изналажење корелације експресије испитиваних гена регулатора раста са биолошким понашањем и хистопатолошким статусом испитиваних неопролиферација
8. Испитивање корелације експресије наведених онкогена у односу на локализацију.
9. Испитивање међусобног односа имуноензимске експресије испитиваних регулаторних гена и адхезионих молекула.



Актуелност истраживања:

Све већа учесталост тумора коже, у свим земљама света, указује да ови тумори данас постају важан онколошки проблем, тим пре што је стопа смртности од меланома још увек висока (1). Истовремено, без обзира на релативно ниску стопу смртности, кератиноцитни тумори претстављају значајан здравствени проблем будући да чине приближно 90% свих малигнитета коже, а при томе је, за пацијенте са удаљеним метастазама, дуготрајна прогноза лоша јер је десетогодишње преживљавање мање од 10%(2).

Иако је познато да тумори коже не настају „де ново“, постоје бројне дилеме везане за хистогенезу, диференцијалну дијагнозу, па и терапију кожних неоплазми. Разграничења између сигурно бенигну и сигурно малигну лезија клинички су скоро немогућа, нарочито када су у питању ране форме меланома, а не ретко, и ране форме сквамозелуларног карцинома. Разнолике хистолошке слике меланома и карцинома кератиноцитне генезе су добро познате, међутим проблеми настају око дефиниције малигну потенцијала и будућности. Ретроспективне студије су углавном идентификовале појединачне факторе који могу имати утицаја на лечење, али најважније микроскопске карактеристике које су у корелацији са преживљавањем су степен ћелијске (не)зрелости, митозе, лимфна и васкуларна инвазија. Потенцијални прогностички параметри су и степен ангиогенезе и губитак ћелијске адхезије.

Прогресија ћелија кроз различите фазе ћелијског циклуса вођена је циклинима и циклин зависним киназама (CDKs) и њиховим инхибиторима. Експресија CDKs је конститутивна током ћелијског циклуса али у неактивној форми и активирају се фосфорилацијом након везивања за фамилију протеина који се називају циклини. Насупрот CDKs, циклини се синтетишу током специфичних фаза ћелијског циклуса и њихова улога је да активирају CDKs. Након завршеног задатка нивои циклина нагло опадају. Идентификовано је више од 15 циклина: циклини D, E, A и B појављују се секвенцијално током ћелијског циклуса и везују једну или више CDKs (1,3). Активност cyclin-CDK комплекса је регулисана инхибиторима названим CDK инхибитори. Постоје две главне класе CDK инхибитора: Cip/Kip и INK4/ARF фамилија. Ови инхибитори функционишу као тумор супресори и често су измењени у туморима. Cip/Kip фамилија има три компоненте (p21, и p27 и p57), које везују и инактивишу комплексе формиране између циклина и CDKs (4,5). p27 је инхибитор прогресије из G1 у S-фазу ћелијског циклуса, а новија истраживања показују да игра улогу у диференцијацији ћелија, апоптози, инхибицији раста и међућелијским адхезијама (6).

Ћелијски адхезиони молекули су класификовани у пет група: кадхерине, електине интегрине, адхезионе молекуле из породице имуноглобулина. Постоји 4 субкласе кадхерина: E (епителни), P (плацентални), N (неурални) и L-CAM кадхерин. E-кадхерин који би ми испитивали је пептид молекуларне масе 120 kDa кодиран геном 16q22 који се налази у региону у коме су честе хромозомске транслокације. Налази у зонули адхеренс зрелих епителних ћелија где повезује актинске филаменте суседних ћелија. E-кадхерин се типично локализује у ћелијској мембрани. Сматра се да је он супресор туморске инвазије и метастазирања(7).

Познато је да раст и прогресија тумора зависе од ангиогенезе. Ангиогенеза је регулисана бројним факторима раста који се деле на стимулаторе (VEGF, хепатоцитни фактор раста, PDGF итд.) и инхибиторе (ангиостатин, ендостатин итд.), а који се налазе у сталној равнотежи. VEGF је први и најзначајнији стимулатор ангиогенезе. Лучење VEGF изазвају различити цитокини, фактори раста и хипоксија. VEGF узрокује пролиферацију, миграцију и диференцијацију ендотелних ћелија (8).

Афинитет за активирани ендотелне ћелије које учествују у туморској ангиогенези имају ендоглинска антитела. Доказано је да се анти CD105 антитела везују на све новостворене ендотелне ћелије и крвне судове, а само на 20% претходно формираних крвних судова. Не везују се на ћелије туморске строме чиме се смањује број лажно позитивних резултата (9,10). За ендоглин (CD105) се показало да може бити важан прогностички параметар за карциноме плућа, дебелог црева, једњака, дојке, желуца, ендометријума, као и за малигне туморе главе и



врата (9). Истиче се да CD105 представља идеалну мету за примену антиангиогенетске терапије и сматра се добрим показатељем туморске прогнозе (11,12).

Предмет и опис истраживања: (задаци, методологија, очекивани резултати):

Будући да је локална и системска прогресија неопрولیферација удружена са променама антигеног фенотипа то је примарни задатак ове студије испитивање регулатора ћелијског циклуса и ангиогенезе.

Познато је да туморску прогресију карактерише и губитак адхезионих молекула, па је наш други задатак испитивање експресије E-кадхерина у пролиферацијама коже кератиноцитног и меланоцитног порекла.

Имајући на уму да меланом, по својој хистолошкој структури, може да имитира различите типове карцинома и саркома, то је задатак студије и евалуација специфичности и сензитивности диференцијационих антигена за меланоцитне кожне пролиферације.

За истраживање би користили трогодишњи (2006, 2007 и 2008 год) оперативни материјал Клинике за пластичну и реконструктивну хирургију Клиничког центра Крагујевац, који је био фиксиран у 10% раствору формалдехида. У служби за Патологију КЦ-Крагујевац оперативни материјал је рутински обрађиван и калупњен у парафин. Ретроспективном анализом препарата добијених са парафинских блокова би микроморфолошком анализом формирали две *сасвим независне* циљне групе:

А. Кератиноцитне пролиферације (834 случаја) и

Б. Меланоцитне пролиферације (509 случајева).

А. Из кератиноцитног спектра пролиферација би направили 6 експерименталних подгрупа у којима би испитивали експресију напред наведених регулатора раста.

1. 140 себороичних кератоза
2. 46 кератоакантома
3. 56 соларних кератоза
4. 4 Bowen-ове болести
5. 509 базоцелуларним карциномом и
6. 79 сквамозелуларних карцинома

Б. Из меланоцитног спектра пролиферација би направили 4 експерименталне подгрупе:

1. 21 суперфицијално ширећи меланом
2. 35 нодуларних меланома
3. 151 епидермо-дермални невус
4. 302 интрадермална невуса

За реализацију истакнутих циљева би користили следеће микроморфолошке методе:

1. Рутинска хематоксилин-еозин (H&E) метода за диференцијацију патохистолошких лезија
2. Хистохемијска VanGieson метода за испитивање колагених влакана
3. Цитохемијска Toluidine Blue метода за испитивање мастоцитне стромне реакције
4. Имунохистохемијска ABC метода са AE1/AE3 антителима за идентификацију кератиноцитних лезија
5. Имунохистохемијска ABC метода са HMB-45 и PNL2 антителима за идентификацију меланоцитних пролиферација
6. Имунохистохемијска ABC метода са Cyclin E, Cyclin D, p27, p57, VEGF-a, CD105 и E-кадхеринским антителима

За процену степена ангиогенезе ће се радити квантитативна анализа, мерењем густине интра туморске микроциркулације (MVD), бројањем крвних судова у зони са њиховом највећом густином („врх тачке“). О величини видног поља и начину бројања ћемо користити упуства Weidner-а и сар (1992).

Након добијених података о броју крвних судова за сваког пацијента, ће се израчунати медијана у односу на коју ће испитаници бити подељени у две групе: пацијенти са ниским



степеном ангиогенезе (број крвних судова у туморском ткиву мањи или једнак вредности медијане) и болесници са високим степенем ангиогенезе (број крвних судова у туморском ткиву већи од вредности медијане).

За одређивање вредности експресије регулатора ћелијског циклуса користила би се метода „X skora“, која се изражава процентуално на најмање 100 преко микрометарске мрежице избројаних ћелија са следећим нивоима експресије: (- ; 0-5%), (+; 6-25%), (++; 26-50%), (+++; 51-75%) и (++++; 75-100%)

Вредност експресије би претстављала проценат имунореактивних ћелија. Затим би била одређена медијана и испитаници би такође били подељени у две групе: они са ниским степенем експресије (процент мањи или једнак вредности медијане) и они са високим степенем експресије (процент већи од вредности медијане). Сви добијени подаци ће бити табеларно приказивани и припремани за адекватну статистичку обраду (нпр X^2 тест, Mann-Whitney U, Wilcoxon-Rang, Kruskal-Wallis тест и др. у зависности од потреба)

Очекујемо да ће, резултати експресије испитиваних регулатора раста и њихова корелација са клиничко-патолошким статусом испитаника, помоћи:

1. Да се издвоје пацијенти са ниским ризиком за развој агресивне болести чиме би многи болесници били поштеђени од агресивне терапије и компликација насталих због ње.
2. Да се прецизније процени биолошко понашање тумора и у раном стадијуму болести препознају болесници са високим ризиком за појаву метастаза и/или рецидива.

Значај истраживања

1. Испитивање експресије регулатора ћелијског раста и ангиогенезе како за туморе меланоцитног, тако и за туморе кератиноцитног порекла, поред дијагностичког има и терапијски значај због правовремене и адекватне употребе инхибитора ангиогенезе.
2. Наведено истраживање ће помоћи и да се ближе дефинишу препоруке за минималну хируршку маргину потребну за високи проценат радикалности хируршке интервенције.

Временски оквир

Обзиром на број случајева укључених у истраживање (1343) и комплексну методологију (хистопатологија, хистохемија, цитохемија, имуноцитохемија и бројне статистичке методе), сматрамо да је за реализацију овог пројекта потребно 4 (четири) године.

Литература:

1. World Health Organisation Classification of Tumours: Pathology and genetics of skin Tumours. IARC, Lyon, 2006
2. Bumpous J. Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma to the parotid and cervical lymph nodes: treatment and outcomes. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2009, 17(2):122-5.
3. Ekholm SV, Red SI: Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. Curr Opin Cell Biol, 2000;12:676
4. Sherr CJ: The INK4a/ARF network in tumor suppression. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2:731
5. Curry JL, Richards HW, Huttenbach YT et al : Different expression patterns of p27 (KIP1) and p57 (KIP2) proteins in benign and malignant melanocytic neoplasms and in cultured human melanocytes. J Cutan Pathol, 2009; 36:197-205
6. Denicourt C, Saeny CC, Datnow B et al: relocalised p27 tumor suppressor functions as a cytoplasmic metastatic oncogene in melanoma. Cancer Res, 2007; 67:9238-43



7. Pecina- Slaus N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int.* 2003;3(1):1
8. Conti CJ: Vascular endothelial growth factor: regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. *The Oncologist*, 2002; (suppl)3:4-11
9. Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, et al. Organ- specific endoglin (CD105) expression in the angiogenesis of human cancers. *Pathol Int* ; 2006; 56(12):717- 23
10. Saad RS, Liu YL, Nathan G, et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol*,2004;17:197-203
11. Duff SE, Li C, Garland JM, et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J* , 2003; 17:984-92,
12. Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, et al: Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene* 2003;22:6557-63.