



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта : УТИЦАЈ ЕКСПРЕСИЈЕ СОХ-2, Р27 И VEGF НА СТВАРАЊЕ НОВИХ КРВНИХ И ЛИМФНИХ СУДОВА У ТКИВУ КЛАСИЧНИХ И ФОЛИКУЛАРНИХ ВАРИЈАНТИ ПАПИЛАРНОГ КАРЦИНОМА ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ

Кључне речи : папиларни карцином штитасте жлезде, циклооксигеназа 2 (СОХ2), р27, фактор раста васкуларног ендотела (VEGF), D2-40, ангиогенеза

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Папиларни карциноми штитасте жлезде чине више од 80% малигну епителних тумора штитасте жлезде. Иако су ови карциноми добро диферентовани, код одређеног броја пацијената (11%), у време дијагностиковања, присутна је дисеминација у лимфним чворовима врата и медијастинума. Многи клинички и патолошки параметри као што су старост и пол пацијента, величина тумора, екстратироидно ширење тумора, метастазе у регионалним лимфним чворовима, удаљене метастазе, васкуларна инвазија, хистолошки тип и мултифокалност раста користе као прогностички фактори папиларних карцинома.

Посебан проблем представља дијагностика и молекуларно биолошки профил, све чешћих, фоликуларних варијанти папиларног карцинома (FvPC, од енгл.), који чине 18% папиларних карцинома. Резултати молекуларно биолошких истраживања показали су да су ови тумори ближи молекуларном профилу фоликуларних карцинома.

Одређивање стадијума на основу TNM (енгл.) класификације је водич за одређивање постоперативне терапије и праћење РС. Међитим, хистолошке варијанте РС у комбинацији са молекуларно биолошким профилем могу бити од значаја као предикторни фактори у издвајању тумора са метастатским потенцијалом и правовременим одабиром адекватне терапије.

Ова студија ће представљати ретроспективну анализу експресије VEGF, СОХ2 и р27 код папилоцелуларног карцинома штитасте жлезде као и повезаност ових маркера са неоангиогенезом и неолимфогенезом, неопходних за инвазију и метастазирање тумора. Циљ истраживања је испитати корелацију експресије биолошких маркера са класичним прогностичким факторима.



Циљ истраживања:

Генерални циљ је да се испита значај експресије COX-2, VEGF и p27 на стварање крвних и лимфних судова код класичног и фоликуларног подтипа папиларног карцинома штитасте жлезде.

У складу са општим циљем поставили смо следеће конкретне задатке:

1. Анализа експресије COX2, VEGF и p27 у исечцима ткива папиларног и фоликуларног карцинома штитасте жлезде
2. Испитати корелацију експресије COX2, VEGF и p27 са експресијом CD31 и D2-40 као маркера ендотелних ћелија крвних и лимфних судова
3. Испитати корелацију експресије CD31 и D2-40 са патохистолошким и клиничким стадијумима болести

Актуелност истраживања:

Папиларни карциноми (PC) штитасте жлезде чине више од 80% малигних епителних тумора овог органа. Иако, добро диферентовани, у 11% болесника генеришу метастазе у регионалним лимфним чворовима (1; 2; 3).

Ангиогенеза је важан процес у инвазији и метастазирању тумора у удаљене органе. На овај процес утичу специфични фактори раста, активација рецептора ендотелних ћелија, профиферативни капацитет ендотелних ћелија и различитих компоненти екстраћелијског матрикса. Међу бројним факторима ангиогенезе централно место заузима фактор раста васкуларног ендотела (VEGF, енгл. Vascular Endothelial Growth Factor) (4).

p27 је инхибитор комплекса циклин-циклин зависне киназе и неопходан је фактор прогресије ћелијског циклуса (5). Сnižена експресија p27 протеина регистрована је код различитих типова малигних тумора (6) (7). Многа истраживања показују да снижена експресија p27 доприноси канцерогенези штитасте жлезде (8; 9). Скорије истраживање указује на важну улогу p27 у ангиогенези тумора (10). p27 је неопходан за формирање VEGF продукујућих ћелија у костној сржи које директно учествују у стварању крвних судова у туморској миукросредини (10).

Cyclooxygenase 2 (COX2) је ензим који катализује формирање простагландина из арахидонске киселине (11). Повећана експресија COX2 регистрована је код многих типова тумора (12; 13; 14; 15; 16) укључујући и карцином штитасте жлезде (11; 17), што може да укаже на његову важну улогу како у канцерогенези тако и у прогресији тумора. Многе студије сугеришу да COX2 није само одговоран за ћелијску пролиферацију и малигну трансформацију већ учествује и у ангиогенези, вероватно као регулатор транскрипције гена за VEGF (18).



У овом истраживању испитиваће се корелација експресије VEGF, COX-2 и p27 са густином крвних и лимфних судова, одређивањем експресије маркера ендотелних ћелија крвних (CD31) и лимфних (D2-40) судова, у ткиву класичног и фоликуларног подтипа папиларног карцинома штитасте жлезде. У нама доступној литератури нема података о овој корелацији за ове туморе штитасте жлезде.

Предмет и опис истраживања:

задачи, методологија, очекивани резултати

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ:

Студија ће представљати ретроспективну анализу оперативно добијеног материјала (лобектомија, тоталних тиреоидектомија, регионалних лимфаденектомија) код 70 болесника са РС, мушког и женског пола, са Хируршке Клинике, Војномедицинске академије у периоду од 1. јануара 2009. до 30. септембра 2012 год. Анализом ће бити обухваћени параметри као што су пол, године старости пацијената, стадијум болести, величина тумора, хистолошки тип РС, мултифокалност раста РС, екстратироидно ширење тумора, васкуларна инвазија и постојање локалних и удаљених метастаза.

У рутинској обради препарата, узорци ткива ће се фиксирати у 4% пуферисаном раствору формалина, у току 24h, на собној температури. По завршеној фиксацији, уследиће дехидратација исечака како би се у њима уклонила вода. Другим речима, узорци ће се потапати у серију алкохола растуће концентрације и то следећим редом: најпре 1 минут у 70% алкохолу, затим 2 пута по 50 секунди у 96% и на крају 2 пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу. Након дехидратације узорци ће се просветлити у ксилолу и калупити у парафин. За патохистолошку анализу микротомом ће се сећи ткивни пресеци дебљине 4 μ m. После депарафинисања у ксилолу и хидратације у опадајућем реду алкохола, исечци ће се обојити хематоксилин-еозином (*hematoxylin-eosin*). На крају ћемо на ткивне исечке наносити Canada-у balsam и прекрити их покровним стаклима.

Одређивање нивоа експресије COX-2, VEGF и p27 у туморском ткиву

Одређивање нивоа експресије COX-2, VEGF и p27 обавиће се имунохистохемијском техником на парафинским исечцима. За њихову детекцију користићемо одговарајућа мишија антихумана моноклонска антитела (анти- COX-2, анти- p27kip1, анти- VEGF). Као систем за визуелизацију користиће се En Vision TM detection Systems Peroxidase а као хромоген супстрат користиће се DAB Liquid. Препарати ће бити контрастно обојени Мауег-овим хематоксилином. Користићемо одговарајућа ткива као позитивне контроле, а као негативне контроле користићемо ирелевантна моноклонска антитела.

Експресија COX-2 ће бити анализирана микроскопирањем на основу процента позитивних туморских ћелија у 10 видних поља (увеличање 40X) и биће класификована у три категорије :



дифузна позитивност (++) , када је више од 50% ћелија позитивно; хетерогена позитивност (+), позитивних од 10-49% туморских ћелија; негативан налаз (-), када је мање од 10% туморских ћелија позитивно (19).

Ниво експресије p27 одредиће се бројањем на 500 туморских ћелија и 500 неизмењених ћелија штитасте жлезде на увећању 100X а у анализу ће бити укључени и нуклеарна и/ или цитоплазматска пребојеност (20).

Вредности VEGF ће бити одређиване на основу цитоплазматског бојења у туморским ћелијама и ћелијама строме: скор 0- нема позитивне реакције; скор 1- мање од 10% ћелија показују позитивност; скор 2- позитивност у 11-50% ћелија; скор 3- позитивно више од 50% ћелија (21).

Анализа степена ангиогенезе и лимфогенезе у туморском ткиву

За анализу степена ангиогенезе и лимфогенезе у овој студији биће коришћена имунохистохемијска техника уз коришћење мишијих антихуманих моноклонских антитела (анти- D2-40 и анти-CD31) као маркера ендотелних ћелија лимфних и крвних судова . Анализа ће бити обављена бројањем крвних и лимфних судова у зони са њиховом највећом густином („hot spots“). Користиће се препоруке које је дао Weinder о величини видног поља и начину бројања (23). Места највеће густине крвних и лимфних судова ће бити одређивана на увећању (40X).

Цитоплазматска пребојеност D2-40 и CD31 ће се изразити као: негативна (-); слабо позитивна (+), средње позитивна (++) , јака позитивна експресија (+++) (22).

Статистичка обрада података

Величина узорка је израчуната на основу података о вредностима густине туморске микроциркулације, публикованих у студијама сличног дизајна. Студијски узорак је израчунат узимајући α као 0.05 и снагу студије од 0.8 за *Student's t* тест (два независна узорка), поредећи групе међу собом (у оба смера), према статистичком програму G*Power3. С` обзиром да је за вредности густине туморске микроциркулације нађена најмања разлика између група фоликуларних типова папиларног карцинома и класичних типова папиларног карцинома, ова вредност је коришћена за израчунавање величине узорка. Разлика у вредностима густине туморске микроциркулације међу групама износила је 69.07 крвних судова/5 видних поља, а стандардна девијација 110.25 и утврђени број узорака према групама износи 15 за сваку од група, али користимо по 20 узорака у свакој групи. Овакав студијски узорак претпоставља утврђивање статистички значајне разлике (*Student's t* тестом за два независна узорка или *Mann-Whitney* тестом) између две групе тумора, са снагом студије $\geq 80\%$.



Подаци ће бити анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Пре статистичке обраде података, прво ће се испитати правилност расподеле добијених вредности (величина узорка одређује који ћемо тест користити за ту проверу). За поређење средњих вредности променљиве двеју популација користиће се параметарски *Student's t* тест, уколико вредности буду имале правилну расподелу, док ће се неправилна расподела поредити коришћењем непараметарског *Mann-Whitney* теста. Испитивање зависности две описне променљиве испитиваће се помоћу χ^2 и *Fisher*-овог теста. Испитивање утицаја више променљивих на бинарну променљиву помоћу мултиваријанте бинарне логистичке регресије. Резултати експеримента ће се изражавати као вредност \pm стандардна грешка (SE). Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износи $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $p < 0.01$.

Значај истраживања

У овој студији ће се испитати значај експресије COX2, p27, VEGF на густину крвних и лимфних судова, одређивањем експресије маркера ендотелних ћелија крвних (CD31) и лимфних (D2-40) судова, као и веза са патохистолошким и клиничким стадијумима класичног и фоликуларног подтипа папиларног карцинома штитасте жлезде.

Резултати овог истраживања могу да укажу на нове прогностичке као и терапијске апликације. Након тиреоидектомије, код болесника са метастатском болешћу који су кандидати за аблативну терапију радиоактивним јодом, као и код болесника са pT1 стадијумом и високим ризиком прогресије малигне болести, постоперативна модификација лечења могла би да обухвати и примену инхибитора COX2, VEGF и лимфангиогенезе као могућу селективну антитуморску терапију.

Временски оквир

Истраживање ће се спровести у периоду од две године.



Литература

1. **Force., Thyroid Carcinoma Task.** AACE/AAES Medical/Surgical Guidelines for Clinical Practice: Management of Thyroid Carcinoma. AACE Guidelines. Available at http://www.aace.com/pub/pdf/guidelines/thyroid_carcinoma.pdf. Accessed December 16, 2009.
2. **Oncology., National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in.** Thyroid carcinoma. National Comprehensive Cancer Network. Available at http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/thyroid.pdf. Accessed 12/16/2009.
3. **Tumours., World Health Organization Classification of.** Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs (eds DeLellis, R. A., Lloyd R. V., Heitz, P. U. & Eng, C.) (IARC Press, Lyon, 2004).
4. **Erdem H, Gündogdu C, Sipal S.** Correlation of E-cadherin, VEGF, COX-2 expression to prognostic parameters in papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2011; 90(3):312-317. .
5. **Sa G, Guo Y, Stacey DW.** The regulation of S phase initiation by p27Kip1 in NIH3T3 cells. *Cell Cycle* 2005; 4:618–627.
6. **Chu IM, Hengst L, Slingerland JM.** The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2008; 8:253–267.
7. **Slingerland J, Pagano M.** Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 183:10–17.
8. **Khoo ML, Beasley NJ, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL.** Overexpression of cyclin D1 and underexpression of p27 predict lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87:1814–1818.
9. **Baldassarre G, Belletti B, Bruni P, Boccia A, Trapasso F, Pentimalli F, Barone MV, Chiappetta G, Vento MT, Spiezia S et al.i.** Overexpressed cyclin D3 contributes to retaining the growth inhibitor p27 in the cytoplasm of thyroid tumor cells. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 104:865–874.
10. **Vidal A, Zacharoulis S, Guo W, Shaffer D, Giacotti F, Bramley AH, de la Hoz C, Jensen KK, Kato D, MacDonald DD, Knowles J, Yeh N, Frohman LA, Rafii S, Lyden D, Koff A.** p130Rb2 and p27kip1 cooperate to control mobilization of angiogenic progenitors from the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(19):6890-6895. .
11. **Krawczyk-Rusiecka K, Lewiński A.** Cyclooxygenase-2 expression and its association with thyroid lesions. *Arch Med Sci* 2010; 6(5): 653–657. .



12. **Hayashi N, Yamamoto H, Hiraoka N, et al.** Differential expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human bile duct epithelial cells and bile duct neoplasm. *Hepatology* 2001; 34: 638-50.
13. **Okami J, Yamamoto H, Fujiwara Y, et al.** Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2018-24.
14. **Agoff SN, Brentnall TA, Crispin DA, et al.** The role of cyclooxygenase-2 in ulcerative colitis-associated neoplasia. *Am J Pathol* 2000; 157: 737-45.
15. **Shirahama T, Sakakura C.** Overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 558-61.
16. **Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al.** COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors. *Cancer* 2000; 89: 2637-45.
17. **Ito Y, Yoshida H, Nakano K, et al.** Cyclooxygenase-2 expression in thyroid neoplasms. *Histopathology* 2003; 42: 492-7.
18. **Ji B, Liu Y, Zhang P, Wang Y, Wang G.** COX-2 expression and tumor angiogenesis in thyroid carcinoma patients among northeast Chinese population-result of a single-center study. *Int J Med Sci* 2012; 9(3):237-42. .
19. **Illouz F, Laboureau-Soares S, Dubois S, Rohmer V, Rodien P.** Tyrosine kinase inhibitors and modifications of thyroid function tests: a review. *Eur J Endocrinol* 2009;160(3):331-6.
20. **Jihyun Ahn, Soon Auck Hong , Seung-eun Lee.** Cytoplasmatic localisation of Jab1 and p27kip1 Might be Associated with invasiveness of Papillary Thyroid Carcinoma. *Endocrine Journal* 2009; 56(5): 707-713.
21. **Paivi Siironen, Ari Ristimaki, Kirsi Narko.** VEGF-C and COX-2 expression in papillary thyroid cancer. *Endokrin- Related Cancer* 2006; 13: 465-473.
22. **Kahin HJ, Bailey D, Marks A.** Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi s sarcoma and a subse of angiosarcoma. *Mod Pathol* 2002; 15: 434-440.
23. **Weidner N.** Intratumor microvessel density as a prognostic factor incancer. *Am J Pathol* 1995;147:9-19.22.