

EKSPRESIJA PROTEINA ODRŽAVANJA MINIHROMOZOMA U KERATINOCITNOJ INTRAEPIDERMALNOJ NEOPLAZIJI I INVAZIVNOM PLANOCELULARNOM KARCINOMU KOŽE

UVOD

Aktinična keratoza (AK) predstavlja proliferaciju transformisanih, neoplastičnih keratinocita ograničenih na deo epiderma, a izazvana je ultravioletnim (UV) zračenjem (1). Ranije definisana kao prekancerozna lezija, AK se danas smatra inicijalnom kliničkom manifestacijom bolesti koja može da progredira do planocelularnog karcinoma (engl. squamous cell carcinoma, SCC) i može da se posmatra kao najranija klinički prepoznatljiva manifestacija kutanog planocelularnog karcinoma, rani stadijum u biološkom spektru SCC. Aktiničnu keratozu, dakle, ne treba smatrati premalignom lezijom već malignom neoplazmom, odnosno tipom površnog SCC, tj. AK se ne transformiše u SCC, to je *de facto* SCC (2).

Kutani SCC *in situ* predstavlja intraepidermalni karcinom kod koga se neoplastično transformisani keratinociti nalaze čitavom debljinom epiderma i obuhvata specifične entitete – Bowen-ova bolest (engl. Bowen's disease, BD) i erythroplasia Queyrat (EQ) kada je na genitalijama (3). To je SCC koji nije probio bazalnu membranu, dakle, intraepidermalna forma SCC. Uglavnom je perzistentan i progresivan, sa malim invazivnim malignim potencijalom, mada se može javiti i spontana parcijalna regresija.

Planocelularni karcinom kože je maligna neoplazma koja nastaje od epidermalnih keratinocita. Spada u nemelanomske kancere kože i jedan je od najčešćih humanih maligniteta. Preko 1/3 svih kancera u Sjedinjenim Državama čine nemelanomski kanceri kože (2), a SCC je drugi po učestalosti, posle bazocelularnog karcinoma kože (engl. basal cell carcinoma, BCC) (4). Za razliku BCC od koji uglavnom nastaje *de novo*, SCC u većini slučajeva nastaje iz prethodnih lezija (AK i BD).

SCC je rezultat niza promena koje počinju kada jedan keratinocit doživi molekularne izmene koje ometaju njegovu sposobnost da se normalno diferentuje i sazreva. Prema novijim mišljenjima, invazivni SCC i AK su suprotni krajevi istog spektra, s tim što postoji kontinuum od momenta transformacije keratinocita u atipične neoplastične ćelije pod dejstvom UV zračenja, do proboja ovih ćelija u derm, kada lezija postaje invazivni SCC (5).

Klinički se ne može pouzdano predvideti koja AK će progredirati u SCC ili koji pacijent će razviti metastatski SCC. Zbog toga što je SCC po učestalosti druga najčešća kutana neoplazma sa značajnim morbiditetom i mortalitetom, AK treba posmatrati kao i druge preinvazivne neoplazme skvamoznog epitela (grlića materice ili oralne sluznice) (1,6). Radi

bolje interpretacije ovog entiteta nedavno je predložena nova terminologija koja adekvatnije odslikava malignu prirodu AK (1,6). Kako AK predstavlja proliferaciju keratinocita ograničenu na epiderm, predložen je naziv keratinocitna intraepidermalna neoplazija (KIN) (6). Ovaj naziv je analogan nazivu cervikalna intraepitelna neoplazija (CIN) koji se koristi u ginekološkoj patologiji za neoplastične lezije grlića materice. Neoplastične lezije ograničene na epiderm podeljene su prema kliničkim karakteristikama, stepenu citološke atipije epidermalnih keratinocita i obima zahvaćenosti epiderma u tri kategorije: KIN 1, KIN 2 i KIN 3 (1).

Kancer nastaje uglavnom mutacijama somatskih ćelija i najčešće nije rezultat jedne mutacije već je posledica genetskih poremećaja koji se akumuliraju tokom vremena. Tumorigeneza u humanim ćelijama je, stoga, proces koji podrezumeva mnogobrojne korake (7). Nekontrolisana proliferacija ćelija je glavna odlika kancera, a tumorske ćelije imaju oštećenja gena koji su direktno uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa. Ćelijski ciklus je veoma pažljivo regulisan i organizovan proces, koji odgovara specifičnim potrebama određenog tkiva ili tipu ćelija. Sastoji od udvostručavanja DNK u identične kopije hromozoma tokom sintetske faze (engl. synthesis phase, S) i faze deobe (engl. mitosis phase, M) kada se ćelija i njen sadržaj deli podjednako u dve ćerke ćelije. Naše znanje o molekulima koji učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa je relativno novo i nekompletno. Do sada je poznato nekoliko različitih grupa proteina, sa različitom ulogom u određenom delu ciklusa. Ključnu ulogu u smislu regulacije imaju ciklini, ciklin zavisne kinaze (engl. cyclin dependent kinases, CDK) i inhibitori kinaza (engl. cyclin dependent kinases inhibitors, CDKI). Poslednjih godina posebno se proučava uloga jedne nove grupe proteina koji su nazvani proteini održavanja minihromozoma (engl. minichromosome maintenance proteins - MCM) i čija je uloga omogućavanje pravilne replikacije DNK tokom ćelijskog ciklusa. MCM je grupa jedarnih proteina, čije prisustvo je utvrđeno u svim eukariotskim ćelijama, koji omogućavaju započinjanje i održavanje replikacije DNK molekula. (8). Usklađenost funkcionalne interakcije između MCM proteina i drugih komponenti posredstvom protein kinaza koje učestvuju u regulaciji ćelijskog ciklusa omogućava početak samo jedne sinteze DNK molekula tokom svakog ćelijskog ciklusa (9). Njihova uloga udružena je i sa ulogom transkripcionih faktora, sto sugerise da su ovi proteini uključeni i u proces transkripcije DNK. MCM proteini eksprimovani su u ćelijama u kojima je ćelijski ciklus u toku, dok se u ćelijama koje su u stanju mirovanja i diferencijacije njihova ekspresija gubi (10) tako da predstavljaju potencijalno korisne markere proliferacije ćelija, osobito u tumorima (11).

Uloga i funkcija MCM proteina ispitivana je tokom poslednje decenije u različitim tumorima (12). U koži je ekspresija MCM proteina proučavana u relativno malom broju

studija: MCM 2 u BCC (13,14), MCM4, MCM6 i MCM7, u karcinomu Merkelovih ćelija (15), MCM3 i MCM4 i MCM7 u benignim i malignim melanocitnim lezijama (16). Samo u dva rada analizirani su MCM2, odnosno MCM5 u AK (17) i planocelularnom karcinomu kože (13). Ispitivanja koja bi obuhvatala preinavazivne lezije (AK i BD) i SCC sa više MCM proteina nisu do sada publikovana, a i dva objavljena analiziraju manji broj slučajeva. Takođe, osim tumorskog gradusa, nije bilo studija ispoljavanja MCM proteina u odnosu na druge prognostičke parametre SCC kože kao što su maksimalna debljina, dubina invazije i dimenzije, niti je vršena uporedna evaluacija ispoljavanja MCM molekula različitim metodama (semikvantitativno, indeks obeležavanja, distribucija pozitivnih ćelija).

Činjenica da se ekspresija MCM proteina povećava u neoplastičnim ćelijama upućuje na još jedan, veoma značajan aspekt istraživanja ovih proteina, a to je potencijalna upotreba ovih molekula u novom pristupu adjuvantnoj antikancerskoj terapiji. Značajna ideja, u tom smislu je činjenica da se ekspresija MCM molekula i mRNA ovih proteina razlikuje (povećava) u ćelijama kancera u odnosu na ćelije normalnog tkiva, a da specifični inhibitori aktivnosti ovih molekula mogu da uticu na inhibiciju proliferacije specifičnih neoplastičnih ćelija. Rezultati početnih istraživanja pokazuju da bi MCM molekuli mogli biti idealna meta antikancerske terapije (18).

RADNA HIPOTEZA

Postoji razlika u obimu ispoljavanja i distribuciji MCM 2, 5 i 7 u in situ keratinocitnim lezijama i invazivnom planocelularnom karcinomu kože, odražavajući molekularne izmene koje vode različitim morfološkim oblicima kontinuirane tumorske transformacije. Takođe, dobijeni rezultati bi pokazali razlike nivoa i distribucije MCM proteina 2, 5 i 7 u planocelularnom karcinomu kože u odnosu na prognostičke parametre – dimenzije, dubinu invazije, debljinu i histološki gradus.

CILJEVI

1. Ispitivanje ekspresije MCM 2, 5 i 7 u aktiničnoj keratozi, Bowen-ovoj bolesti i invazivnom planocelularnom karcinomu kože.
2. Analiza ispoljavanja MCM 2, 5 i 7 u in situ lezijama klasifikovanim kao keratinocitna intraepidermalna neoplazija (KIN).
3. Poređenje ekspresije MCM 2,5 i 7 i prognostičkih parametara planocelularnog karcinoma kože – dimenzije, dubina invazije, debljina i gradus tumora.
4. Procena različitih načina evaluacije imunosistohemijskog bojenja i ekspresije MCM proteina u odnosu na tip lezije i prognostičke parametre.

MATERIJAL I METOD

Koristiće se arhivski materijal (parafinski kalupi) Instituta za patologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Uzorak će činiti 300 slučajeva od kojih 150 in situ lezija (aktinična keratoza i Bownova bolest) i 150 invazivnih planocelularnih karcinoma. Od in situ lezija po 50 će biti KIN1, KIN2 i KIN3, a od planocelularnih karcinoma po 50 dobro, srednje i slabo diferentovanih. Slučajevi će biti birani redno od 2011. godine unazad do popunjavanja svake navedene grupe.

Potom će se na hematoksilin-eozin (HE) bojenim pločicama u svakom uzorku flomasterom različite boje označavati tri tipična mesta sa kojih će se iz odgovarajućeg parafinskog kalupa (kalup davalac), iglom unutrašnjeg promera 1,2 mm uzimati tkivni cilindri za formiranje tkivnog mikroniza (tissue microarray – TMA). Ukupno 60 tkivnih cilindara (20 slučajeva) će biti prenošeno u svaki kalup primalac u 6 kolona i 10 redova, uz dodatna 2 cilindra (uzorci limfnog nodusa i sluznice tankog creva) koji će biti postavljeni u prvom i poslednjem redu za orijentaciju TMA i kao pozitivne kontrole pri imunohistohemijskom bojenju. Po formiranju pojedinačnog TMA u metalni kalup se izliva tečni parafin iz kojeg će se, posle hladjenja, na mikrotomu najpre uraditi presek za HE bojenje kojim se kontroliše da li uzorak odgovara planiranom.

Tehnika tkivnog mikroniza omogućava ispitivanje većeg broja uzoraka sa znatno manjim utroškom antitela i drugih hemikalija, uz minimalno oštećenje parafinskih kalupa iz kojih se materijal uzima za razliku od klasične analize koja često dovodi do potpune istrošenosti materijala. Dva do tri tkivna cilindra po uzorku su se pokazala boljim od pojedinačnih uzoraka i u potpunosti odgovarajućim kada su poređeni u odnosu na rezultate na celim isečcima (Simon 2004).

Za svaki konstruisani kalup sa TMN popunjava se tabela u programu Excel u kojoj je svaki tkivni cilindar obeležen identifikacionim brojem kalupa i bojom kojom su označeni različiti delovi tumora na HE bojenim preparatima. Na taj način se formira mapa za svaki TMN koja omogućava prepoznavanje uzorka i delova tumora koji se ispituju na presecima tkivnih cilindara.

Iz novoformiranih parafinskih kalupa sa TMN na mikrotomu se seku isecci debljine 5 mikrona na adhezivne pločice na kojima će u daljem toku istraživanja biti izvedeno imunohistohemijsko bojenje. U cilju maksimalnog održavanja reaktivnosti ispitivanih antigena isecci će se seći sekvencijalno za određene markere, a do momenta bojenja biće čuvani na 4°C što usporava antigensku degradaciju u tankim isečcima. Imunohistohemijsko

bojenje će se vršiti streptavidin-biotin tehnikom, uz primarna antitela na MCM 2, MCM5 i MCM7, i diaminobenzidin kao hromogen.

Obojene pločice će biti analizirane na više načina:

1. Svetlosnim mikroskopom

- a) distribucija imunopozitivnosti - bazalno, površno i difuzno za in situ lezije, odnosno periferno, površno i difuzno za invazivni planoceluladni karcinom
- b) semikvantitativno određivanjem procenta obojenih ćelija (do 10%, >10-50% i >50%)

2. Indeks obeležavanja (Labeling index – LI)

Biće načinjene fotografije digitalnom kamerom visoke rezolucije (Olympus DP70, 12 megapiksela) svakog tkivnog cilindra. Budući da tri tkivna cilindra uzeta iz svakog tumora predstavljaju različite delove uzorka, potencijalno različitih karakteristika, na svakom će biti vršeno određivanje indeksa obeležavanja. U svakom uzorku će biti brojano najmanje 300 ćelija kod in situ promena, odnosno najmanje 500 ćelija za invazivne tumore a indeks obeležavanja će biti određen kao odnos broja pozitivnih od ukupno izbrojanih ćelija na snimku (broj će varirati u zavisnosti od tipa tumora i njegove celularnosti). Brojanje će se vršiti uz primenu ekranske mrežice, metodom ručnog brojanja dodirom i automatski, korišćenjem softvera za analizu slike.

Rezultati imunohistohemijskog bojenja će biti analizirani u odnosu na

- a) tip lezije (aktinična keratoza, Bowenova bolest, invazivni planocelularni karcinom)
- b) obim in situ promene – KIN1, KIN2 i KIN3
- c) kliničke i histopatološke prognostičke parametre SCC – dimenzije, dubina invazije, maksimalna debljina i stepen diferentovanosti

Za određivanje statističke značajnosti odnosa rezultata imunohistohemijskog bojenja i navedenih karakteristika tumora biće primenjeni hi-kvadrat, Mann-Whitney i Kruskal-Wallis test (analize distribucije i semikvantitativne procene obima ekspresije), odnosno ANOVA i multipli t-test (Tuckey), kod analize indeksa obeležavanja. Za ispitivanje odnosa ekspresije pojedinih MCM proteina koristiće se Spearman koeficijent korelacije. P vrednosti manje od 0,05 biće prihvatane kao statistički značajne.

PROCENA KANDIDATA O POTENCIJALNOM NAUČNOM DOPRINOSU

Ova studija bi dala prvi prikaz ekspresije više proteina održavanja minihromozoma u preinvazivnim skvamoznim lezijama kože klasifikovanim kao keratinocitna intraepidermalna neoplazija, kao i prvu analizu odnosa njihovog ispoljavanja i prognostičkih parametara planocelularnog karcinoma kože. Osim pojašnjavanja njihove uloge u evoluciji malignih keratinocitnih promena, rezultati studije bi ukazali na njihovu moguću primenu kao

proliferativnih i prognostičkih markera. Uzimajući u obzir najnovije obećavajuće pokušaje primene genetske terapije pojedinih kancera delovanjem na MCM proteine, ovakve analiza bi u budućnosti mogle postati deo dijagnostičkih procedura koje kandiduju pacijente za takav vid lečenja. U tom slučaju odabir adekvatnog načina evaluacije ekspresije dobija na značaju, a ova studija analizira i različite načine ispitivanja ispoljavanja MCM proteina u odnosu na tipove lezija i prognostičke parametre.

LITERATURA

1. Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol* 2000; 42:11-7.
2. Lober BA, Lober CW, Accola J. Actinic keratosis is squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43:881-2.
3. Miller S, Moresi M. Neoplasms of the skin: actinic keratosis, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. U: Bologna J, Jorizzo J, Rapini R, eds. *Dermatology*, volume 2. London: Mosby, 2003: p1677-1693.
4. Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42:4-7.
5. Anwar J, Wrone DA, Kimyai-Asadi A, Alam M. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol* 2004; 22:189-96.
6. Yantsos VA, Conrad N, Zabawski E, Cockerell CJ. Incipient intraepidermal cutaneous squamous cell carcinoma: a proposal for reclassifying and grading solar (actinic) keratoses. *Semin Cutan Med Surg*. 1999; 18:3-14.
7. Sandal T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *Oncologist* 2002; 7:73-81.
8. Tye BK. MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem*. 1999; 68: 649-86.
9. Maiorano D, Lutzmann M, Mechali M. MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol*. 2006; 18:130-6.
10. Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH, Coleman N. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res* 1999; 5:2121-32.
11. Tachibana KE, Gonzalez MA, Coleman N. Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *J Pathol*. 2005; 205:123-9.
12. Giaginis C, Vgenopoulou S, Vielh P, Theocharis S. MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol Histopathol*. 2010; 25:351-70.

13. Liu H, Takeuchi S, Moroi Y, Lin N, et al. Expression of minichromosome maintenance 5 protein in proliferative and malignant skin diseases. *Int J Dermatol*. 2007; 46:1171-6.
14. Liaw K, Boyd AS. MCM 2 expression in basal cell carcinomas and trichoepitheliomas. *J Cutan Pathol* 2009; 36:1121-2.
15. Gambichler T, Breininger A, Rotterdam S, Altmeyer P, Stücker M, Kreuter A. Expression of minichromosome maintenance proteins in Merkel cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23:1184-8.
16. Gambichler T, Shtern M, Rotterdam S et al. Minichromosome maintenance proteins are useful adjuncts to differentiate between benign and malignant melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol*. 2009; 60:808-13.
17. Shin JW, Kim YK, Cho KH. Minichromosome maintenance protein expression according to the grade of atypism in actinic keratosis. *Am J Dermatopathol* 2010; 32:794-8.
18. Toyokawa G, Masuda K, Daigo Y et al. Minichromosome maintenance protein 7 is a potential therapeutic target in human cancer and a novel prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 2011 28;10:65.
19. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *BioTechniques* 2004; 36:98-105.